

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Loricrin-Keratoderma –  
klinische und molekulargenetische Charakterisierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Malenka Mona Gedicke  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Sperling  
2. Prof. Dr. med. H. Traupe  
3. Prof. Dr. W. Küster

Datum der Promotion: 28.02.2006

## Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf der 14. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik in Marburg, 1. – 4. Oktober 2003, vorgestellt:

Gedicke MM, Thiele H, Nürnberg P, Traupe H, Tinschert S, Hennies HC; Towards the characterisation of Loricrin keratoderma: diffuse and generalised ichthyosis associated with a loricrin frameshift mutation. Med.Genet. 2003, 15: 325

Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Originalartikel beim British Journal of Dermatology eingereicht:

Gedicke MM, Traupe H, Fischer B, Tinschert S, Hennies HC; Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in loricrin: Analysis of a family and review of the literature. Br.J.Dermatol. 2006, 154: 167-71

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Allgemeine Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Epidermis</b>	<b>1</b>
1.2.1	Aufbau und Bildung der Epidermis	1
1.2.2	Das „cornified envelope“	3
1.2.3	Loricrin	3
<b>1.3</b>	<b>Lamelläre Ichthyose</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Mutilierende Palmoplantarkeratose (Vohwinkel-Syndrom) und Loricrin-Keratoderma</b>	<b>5</b>
1.4.1	Klinisches Bild	5
1.4.2	Mutationen in <i>LOR</i>	6
1.4.3	Mausmodelle	6
<b>1.5</b>	<b>Palmoplantarkeratosen – ausgewählte Formen</b>	<b>8</b>
1.5.1	Epidermolytische und nicht- epidermolytische Palmoplantarkeratose (Vörner-Unna-Thost)	9
1.5.2	Palmoplantarkeratose vom Typ Mal de Meleda	9
1.5.3	Palmoplantarkeratose mit Periodontopathie (Papillon-Lefèvre-Syndrom)	10
1.5.4	Mutilierende Palmoplantarkeratose mit periorifikalen keratotischen Plaques (Olmsted-Syndrom)	10
<b>1.6</b>	<b>Aspekte der molekularen Humangenetik</b>	<b>10</b>
1.6.1	Das Humangenomprojekt	11
1.6.2	Vom Phänotyp zur pathogenetischen Mutation	11
1.6.3	Pyrosequenzierung	12
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>14</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.2	Puffer und Lösungen	17
2.1.3	Kits	17
2.1.4	Gebrauchsmaterialien	18
2.1.5	Geräte	19
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.2.1.1	Primerdesign	20
2.2.1.2	PCR mit Temperaturgradienten	21
2.2.1.3	Touchdown-PCR für die Feinkartierung	22
2.2.1.4	PCR zur Sequenzierung	22
2.2.1.5	PCR zur cDNA-Testung (LOR_C)	23
2.2.1.6	PCR zur RNA-Extraktionskontrolle (G6P)	23
2.2.1.7	PCR zur Pyrosequenzierung	23
2.2.2	DNA-Nachweismethode	24
2.2.2.1	Agarose-Gele	24
2.2.2.2	MegaBACE	24
2.2.2.3	ABI 3730	25
2.2.3	Sequenzierung	25
2.2.3.1	PCR – Aufreinigung	25
2.2.3.2	Sequenzreaktion	25
2.2.3.3	Aufreinigung des Sequenzierproduktes	26
2.2.4	RNA-Extraktion	26
2.2.4.1	Probengewinnung	26
2.2.4.2	RNA- Extraktionsprotokoll aus Blut	27
2.2.4.3	RNA-Extraktionsprotokoll aus Haaren	27
2.2.4.4	RNA-Extraktionsprotokoll aus Haut	27
2.2.4.5	Reverse-Transkriptase-PCR (RT – PCR)	28
2.2.5	Pyrosequenzierung	29

2.2.5.1	Aufreinigung der PCR-Produkte aus einem Agarose-Gel	29
2.2.5.2	Einzelstrangisolierung für die Sequenzreaktion	29
2.2.5.3	Pyrosequenzierung	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Feinkartierung</b>	<b>31</b>
3.1.1	Bereits vorhandene Forschungsergebnisse	31
3.1.2	Haplotypisierung und Feinkartierung	31
3.1.3	Kandidatengensuche	34
<b>3.2</b>	<b>Sequenzierung und Mutationsnachweis</b>	<b>35</b>
3.2.1	Sequenzreaktion	35
3.2.2	Auswertung	37
<b>3.3</b>	<b>Mutationsausschluss bei der autosomal dominanten lamellären Ichthyose (ADLI) in Bezug auf <i>LOR</i></b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>Klinische Diagnostik</b>	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Merkmale im Literaturvergleich</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Diagnostik für Patienten mit der Verdachtsdiagnose Loricrin-Keratoderma</b>	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>RNA-Extraktion</b>	<b>47</b>
3.7.1	RNA-Extraktion aus Blut	48
3.7.2	RNA-Extraktion aus Haarwurzeln	49
3.7.3	RNA-Extraktion aus Haut	50
<b>3.8</b>	<b>Expressionsanalyse auf RNA-Ebene</b>	<b>51</b>
3.8.1	SNP-Suche	51
3.8.2	Pyrosequenzierung	53
3.8.3	Auswertung	55

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Genetische und klinische Diagnose</b>	<b>58</b>
4.1.1	Kandidatengensuche	58
4.1.2	Mutationsfund	59
4.1.3	Merkmaldiskussion für Mutationen im Loricrin-Gen	59
4.1.4	Klinische Einordnung der Familie MDC-804	61
4.1.5	Definition der klinischen Merkmale von Loricrin-Keratoderma	63
<b>4.2</b>	<b>Nomenklatorschwierigkeiten</b>	<b>64</b>
<b>4.3</b>	<b>Standarddiagnostik für <i>LOR</i></b>	<b>65</b>
4.3.1	PCR und Sequenzierung	65
4.3.2	RNA-Isolation	66
4.3.3	Pyrosequenzierung	67
<b>4.4</b>	<b>Mutationsauswirkungen</b>	<b>68</b>
4.4.1	Expression des veränderten Loricrins	68
4.4.2	Auswirkungen des veränderten Loricrins	69
4.4.3	Hinweise auf ein „Backup“-System	69
4.4.4	Verändertes Loricrin in Zusammenhang mit dem „Backup“-System	70
<b>4.5</b>	<b>Fazit der Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADLI	autosomal dominante lamelläre Ichthyose
ATP / GTP / CTP / TTP	Adenosintriposphat / Guanosintriposphat /Cytidintriposphat / Thymintriposphat
b	Base
Blast	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
cDNA	kopierte DNA („copy-DNA“)
CE	„cornified envelope“
cM	Centi-Morgan
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDC	epidermaler Differenzierungskomplex
Exo	Exonuklease
g	Gramm
G/A/T/C	Guanin / Adenin / Thymin / Cytidin
G6P	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
l	Liter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid



min	Minute
M	molar
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPK	Palmplantarkeratose
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („Rotation per minute“)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SAP	„Shrimps Alkaline Phosphatase“
sec	Sekunde
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus („Single Nucleotide Polymorphism“)
SPR	„small proline rich proteins“
SSBP	„single stranded binding protein“
TAE	Tris / Acetat / EDTA
Taq	Termophilus aquaticus
U	Einheit (Unit)
x g	mal Erdbeschleunigung

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

Ziel dieser Arbeit war es, durch die klinische und molekulargenetische Charakterisierung von Loricrin-Keratoderma einen Beitrag zur Systematisierung von selten auftretenden Verhornungsstörungen zu leisten.

In den letzten zwanzig Jahren führte die genetische Forschung auf dem Gebiet der Verhornungsstörungen zu neuen Erkenntnissen über die Ursachen genetisch bedingter Hauterkrankungen, die Klassifikation der Krankheiten sowie die Funktion beteiligter epidermaler Proteine. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Gen des Proteins Loricrin, welches im „cornified envelope“ der Keratinozyten exprimiert wird<sup>28,90</sup>.

## 1.2 Die Epidermis

Die Haut besteht aus drei Schichten. Die äußerste Schicht, die **Epidermis** (Oberhaut), besteht aus verhorntem Plattenepithel. Die **Dermis** (Lederhaut) ist aus straffem und faserreichem Bindegewebe aufgebaut, in dem die Nerven und die versorgenden Gefäße verlaufen. Die **Subkutis** stellt das Fettgewebepolster dar.

Die Epidermis fungiert in erster Linie als Grenzschicht des menschlichen Körpers zur Umwelt. Besonders hervorzuheben sind ihre chemische, mechanische und immunologische Barrierefunktion. Zusätzlich ist sie ein Sinnesorgan und dient der Temperaturregulation<sup>17,38</sup>.

### 1.2.1 Aufbau und Bildung der Epidermis

Über 90% der Epidermis besteht aus Keratinozyten. Diese wandern innerhalb eines dreiwöchigen Differenzierungsprozesses vom Stratum basale an die Oberfläche. Dabei durchlaufen die Keratinozyten folgende epidermale Schichten bei ihrer terminalen Differenzierung von basal nach apikal:

- Stratum basale
- Stratum spinosum

- Stratum granulosum
- Stratum corneum

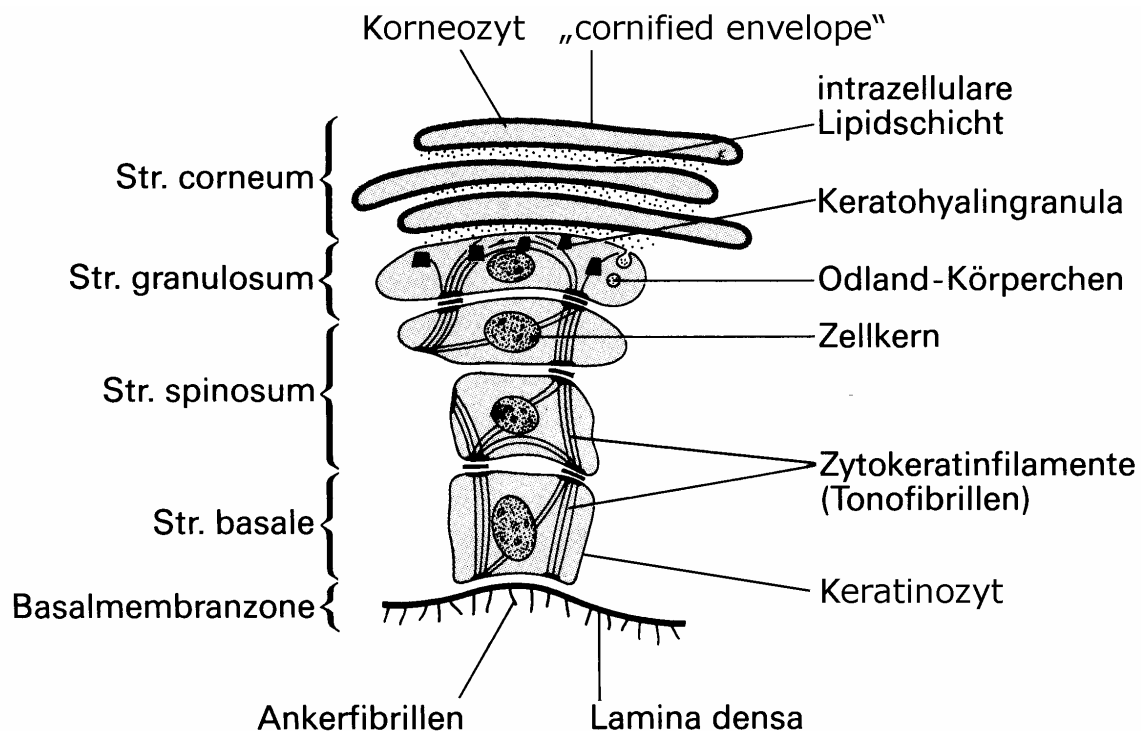


Abb. 1: Keratinisierung der Epidermis<sup>71</sup>

Das einlagige **Stratum basale** sitzt der Basalmembran auf, und die basophilen, kubischen Keratinozyten sind mit ihrer Längsachse vertikal zur Hautoberfläche angeordnet.

Im **Stratum spinosum** (Stachelzellschicht) richten sich die nun polygonalen Keratinozyten horizontal aus. Durch Ausbildung von Desmosomen an ihren Fortsätzen formen die Keratinozyten außerdem ein stabiles Netzwerk. Zusätzlich treten im oberen Stratum spinosum Odland-Körperchen auf (Abb. 1).

Diese Odland-Körperchen werden im **Stratum granulosum** (Körnerzellschicht) in den Interzellularraum ausgeschleust und bilden einen wichtigen Bestandteil der lipidhaltigen Barriere zwischen den Hornzellen. Außerdem werden im Stratum granulosum die stark basophilen Keratohyalinkörper sichtbar, welche die Vorläufer der Keratinmatrix darstellen. Im oberen Stratum granulosum kommt es zu tief greifenden Veränderungen der Keratinozyten. Die Zellkerne und Zellorganellen verschwinden, es folgt eine Dehydrierung, und die Plasmamembran wird durch das „cornified envelope“

(Proteinhülle) ersetzt. Dieser Verhornungsprozess führt zu starren und immobilen Zellen, die fest aneinander fixiert sind (Abb. 1).

Diese Veränderungen sind im **Stratum corneum** (Hornschicht) abgeschlossen. Hier heißen die jetzt kernlosen Zellen Korneozyten (Hornzellen) und sind plättchenartig ineinander verzahnt. Im Zellinnern bestehen die Korneozyten aus Keratinfilamenten in einer amorphen Proteinmatrix. Ummantelt werden diese Zellen vom rigiden „cornified envelope“ (Abb. 1)<sup>10,17,38</sup>.

### 1.2.2 Das „cornified envelope“

Das „cornified envelope“ (CE) ist eine 15 nm dicke, dichte und sehr schwer lösliche Struktur an der inneren Seite der Zellmembran der Korneozyten. Es bildet damit eine protektive Barriere gegen die Umwelt<sup>27</sup> und besteht aus mehreren Proteinen, wie z. B. Involucrin, Filaggrin, Loricrin, „small proline rich proteins“ (SPR), Repetin und Proteinen der S100-Familie<sup>42,72,73</sup>. Die Gene dieser Proteine liegen alle in dem Cluster des epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC), der sich im Bereich Chromosom 1q21 befindet<sup>27,39,51,73,87</sup>. Das CE entwickelt sich während der Keratinisierung, welche eine spezielle Form des programmierten Zelltodes darstellt<sup>32,34</sup>. Es wird vermutet, dass ansteigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen eine Vernetzung von Involucrin-Molekülen untereinander auslösen, die an die innere Zellmembran gebunden werden und somit das Grundgerüst bilden. In einem zweiten Schritt werden vor allem Loricrin und SRPs, aber auch andere Proteine, wie Repetin, durch Transglutaminasen über Disulfidbrücken und N-( $\gamma$ -glutamyl)-Lysin- Isodipeptidbindungen mit dem Grundgerüst verbunden. Keratinintermediärfilamente und Filaggrin bilden Komplexe, die auch mit dem CE vernetzt werden und so die Hauptmasse der terminal differenzierten Keratinozyten darstellen<sup>39</sup>.

### 1.2.3 Loricrin

Das Loricrin-Gen (*LOR*) [Latein: „lorica“ – Rüstung, Panzer<sup>23</sup>] hat mit 78-91% den größten Guanin- und Cytosinegehalt (GC-Gehalt) aller bekannten menschlichen Gene<sup>28,39</sup>. Es ist in 1q21 lokalisiert<sup>51</sup>. *LOR* ist 2,4kb lang und besteht wahrscheinlich aus zwei Exonen. Der RNA-Bereich liegt im zweiten Exon und weist eine Länge von 1,2 kb

auf<sup>58</sup>. Die kodierende Sequenz beträgt 960bp.

*LOR* weist mehrere Sequenzvariationen auf, die im Protein Loricrin meist zu Insertion von vier Aminosäuren in den (Glycin/Serin/Cystein)<sub>n</sub>-Schleifen führen. Diese Variationen scheinen keinen Krankheitswert zu haben, da sie nicht die Funktion des Proteins beeinträchtigen<sup>90</sup>.

Loricrin hat eine Größe von 26 kDa, ist basisch und hochgradig unlöslich<sup>26</sup>. Es besteht aus vielen Wiederholungen von aliphatischen (Glycin/Serin/Cystein)<sub>n</sub>-Schleifen („loops“), die von glutamin- und serinreichen Abschnitten unterbrochen werden. Die übrigen Aminosäuren sind Tyrosin, Phenylalanin oder Isoleucin<sup>28</sup>. Loricrin ist der Hauptbestandteil des CE und wird erstmalig im Stratum granulosum exprimiert<sup>90</sup>.

### 1.3 Lamelläre Ichthyose

Die in dieser Arbeit in einer Familie vorliegende Erkrankung wurde anfangs als autosomal dominante lamelläre Ichthyose diagnostiziert. Aus diesem Grunde wird hier die lamelläre Ichthyose kurz charakterisiert.

Die lamelläre Ichthyose [Griechisch: „ichthys“ – Fisch<sup>54</sup>] stellt eine heterogene Gruppe dar, die zahlreiche Typen von non-bullösen und isolierten kongenitalen Ichthyosen umfasst. In den achtziger und neunziger Jahren wurde eine Unterteilung der Ichthyosen in lamelläre Ichthyose und die non-bullöse ichthyosiforme Erythrodermie vorgeschlagen. Da diese klinische Unterteilung jedoch nicht mit den Genotypen zu korrelieren scheint und viele Zwischenformen der klinischen Unterteilung existieren, werden zum heutigen Zeitpunkt die Begriffe lamelläre Ichthyose oder kongenitale Ichthyose synonym für alle non-bullösen und isolierten kongenitalen Ichthyosen verwendet<sup>2</sup>.

Bei den am häufigsten auftretenden autosomal rezessiven Formen wurden Mutationen im Transglutaminase-1-Gen (*TGM1*) auf Chromosom 14<sup>29,69</sup>, in den Lipoxigenase-Genen (*ALOX12B* und *ALOX E3*) auf Chromosom 17<sup>36</sup>, im *ABCA12*-Gen auf Chromosom 2<sup>47</sup> und in Ichthyin auf Chromosom 5<sup>48</sup> gefunden. Für die selten vorkommenden autosomal dominanten Formen sind bisher noch keine Genloci bekannt<sup>68,81,84,89</sup>.

Viele Patienten mit lamellärer Ichthyose werden als Kollodiumbaby geboren. Das bedeutet, dass Neugeborene von einer zusätzlichen kollodiumartigen Membran umgeben sind. Außerdem weisen die meisten Neugeborenen eine Erythrodermie auf, welche im Schweregrad variiert. Diese Erythrodermie kann persistieren, sich während der kindlichen Entwicklung bessern oder vollständig zurückbilden. Insbesondere die charakteristische Schuppung weist ein weites klinisches Spektrum auf. Sie reicht von einer leichten Ausprägung, welche weißlich-grau, oberflächlich und semihafend in Erscheinung tritt, bis hin zu einer schweren Ausprägung mit großen, plattenartigen, dunkelbraun-grauen und fest adhärennten Schuppen. Die palmoplantare Hyperkeratose geht häufig mit Fissuren und digitalen Kontrakturen einher. Die Hidrosis ist beeinträchtigt. Ein weiteres Zeichen ist ein Ectropium, welches im Schweregrad variiert. Bei etwa der Hälfte der Patienten fallen milde Nageldystrophien auf. Die Zähne zeigen bei den rezessiven Formen ein unauffälliges Erscheinungsbild. Weitere Merkmale können Alopecia, kongenitale Hypoplasie des Ohr- und Nasenknorpels oder Juckreiz sein<sup>20,37,82,83</sup>. Bei der autosomal dominanten Form wurden zusätzlich Lichenifikationen an den dorsalen Seiten der Hände und schwere Karies beschrieben<sup>81,84</sup>.

## **1.4 Mutilierende Palmoplantarkeratose (Vohwinkel-Syndrom) und Loricrin-Keratoderma**

### **1.4.1 Klinisches Bild**

Das klinische Bild dieser mutilierenden Palmoplantarkeratose (PPK) weist gewisse Ähnlichkeiten zur lamellären Ichthyose auf. Eine solche PPK wurde erstmalig 1929 durch Vohwinkel beschrieben<sup>86</sup>. Charakteristisch ist eine honigwabenförmige Struktur. Die Fingerknöchel sind prominent verdickt, und besonders auf der Rückseite der Hände befinden sich seesternförmige Hyperkeratosen. Furchenartige Einschnürungen (Pseudoainhums) führen teilweise zu Autoamputationen der Finger und Zehen. Ist zusätzlich eine Schwerhörigkeit vorhanden, wird diese PPK als echtes Vohwinkel-Syndrom (OMIM 124500) bezeichnet. Dieses Syndrom wird durch eine Mutation im Connexin-26-Gen (*GJB2*) verursacht<sup>49</sup>. Mitte der achtziger Jahre wurde eine Variante dieser PPK ohne das Merkmal der Schwerhörigkeit jedoch mit generalisierter, leichter Ichthyose beschrieben (OMIM 604117)<sup>11</sup>. Sie wird klinisch als Vohwinkel-Syndrom Typ

Camisa bezeichnet. Diese Variante beruht auf einer Mutation im Loricrin-Gen (*LOR*)<sup>50</sup> und ist aus genetischer Sicht der Loricrin-Keratoderma zugehörig<sup>76</sup>. Der Begriff Loricrin-Keratoderma wurde erstmalig 1999 von Takahashi und Mitarbeitern<sup>76</sup> geprägt und im Folgenden in der Literatur aufgegriffen.

#### 1.4.2 Mutationen in *LOR*

In der Literatur wurden bisher sieben Familien mit drei verschiedenen Mutationen in dem Gen *LOR* beschrieben. Die häufigste Mutation 730insG, die zur Veränderung Val231fsX106 auf Produktebene führt, lag in Familien aus Grossbritannien<sup>41,50,60</sup> und Japan<sup>76</sup> vor. Eine weitere Familie mit dieser Mutation erhielt die Diagnose lamelläre Ichthyose (non-bullöse ichthyosiforme Erythrodermie)<sup>53</sup>. In einer Familie aus Nordirland wurde die Mutation 662insT, die zur Veränderung Ser209fsX128 auf Produktebene führt, mit dem Phänotyp Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa gefunden<sup>4</sup>. Bei einer Familie aus Japan mit der Mutation 709insC, die zur Veränderung Glu224fsX113 auf Produktebene führt, wurde die Diagnose progressive symmetrische Erythrokeratodermie gestellt<sup>30</sup>.

Alle drei aufgeführten Insertionen sind Frameshift-Mutationen und führen zu einem verspäteten Stoppkodon. Damit ist das resultierende Protein Loricrin in allen Fällen um 22 Aminosäuren länger. Anstelle eines glutamin- und serinreichen Endes ist das modifizierte Ende durch einen Reichtum an Arginin und Leucin gekennzeichnet<sup>50</sup>. Das veränderte Loricrin weist eine nukleäre Kernzielsequenz („nuclear targeting sequence“) auf<sup>41,75</sup>. Daraus folgt, dass es nicht in das CE integriert, sondern in den Zellkern transportiert wird<sup>31,41,50,75</sup>.

#### 1.4.3 Mausmodelle

Nach Identifikation des Loricrin-Gens und den Mutationsfunden in *LOR* wurden seit 1993 verschiedene Mausmodelle entwickelt, die im Folgenden näher beschrieben werden:

Eine Überexpression von Loricrin führte bei Versuchsmäusen zu keinem abnormalen Phänotyp<sup>91</sup>. Heterozygote *Lor*+/- „knock-out“-Mäuse, denen ein *Lor*-Allel fehlte, waren im Phänotyp nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Homozygote *Lor*-/- „knock-out“-

Mäuse, denen beide *Lor*-Allele fehlten, waren bei Geburt klein und hatten eine glänzende und durchsichtige Haut mit Zeichen der Erythrodermie. Die Größenzunahme entwickelte sich postnatal normal, und die Symptome verschwanden nach vier bis fünf Tagen<sup>40</sup>.

Etwa zeitgleich wurde Mäusen, die zwei Wildtyp-*Lor*-Allele besaßen, ein zusätzliches, mutiertes *Lor*-Allel eingeschleust. Die entstandenen transgenen Mäuse waren in der ersten Generation heterozygot in Bezug auf das zusätzliche mutierte *Lor*-Allel. Diese Mäuse zeigten bei Geburt eine glänzende Haut. Sie entwickelten innerhalb der ersten drei Tage eine feine, über den ganzen Körper verteilte Schuppung (Ichthyose). Allerdings verschwanden diese Merkmale wieder und tauchten auch während der weiteren Entwicklung nicht erneut auf. Die in der zweiten Generation homozygoten transgenen Mäuse wiesen dagegen eine schwere neonatale Erythrokeratodermie mit roter, glänzender Haut auf. Nach fünf Tagen verdickte sich die Epidermis im Gesäßgebiet und an der Basis des Schwanzes. Die Pfoteninnenseiten und Fußsohlen zeigten eine non-epidermolytische Hyperkeratose. Am siebten Tag entstanden Konstriktionen an der Basis des Schwanzes. Distal davon bildete sich eine ödematöse Auftreibung. Es kam nicht zu Autoamputationen. Ab dem elften Tag kam es auch bei diesen Mäusen zur Rückbildung aller Merkmale<sup>75</sup>.

In einem weiteren Experiment wurden die homozygot transgenen Mäuse mit *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen gepaart. Die daraus entstandene Tochtergeneration zeigte nur einen leichten Anstieg im Schweregrad der Merkmale im Vergleich zu den homozygot transgenen Mäusen. Durch die Paarung innerhalb dieser F1-Generation entstanden homozygot transgene, homozygot *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäuse (Abb. 2). Diese Mäuse zeigten überraschender Weise einen sehr viel schwereren Phänotyp als die homozygot transgenen Mäuse<sup>75</sup>. Diese Befunde werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit später ausführlich diskutiert (Abschnitt 4.4).



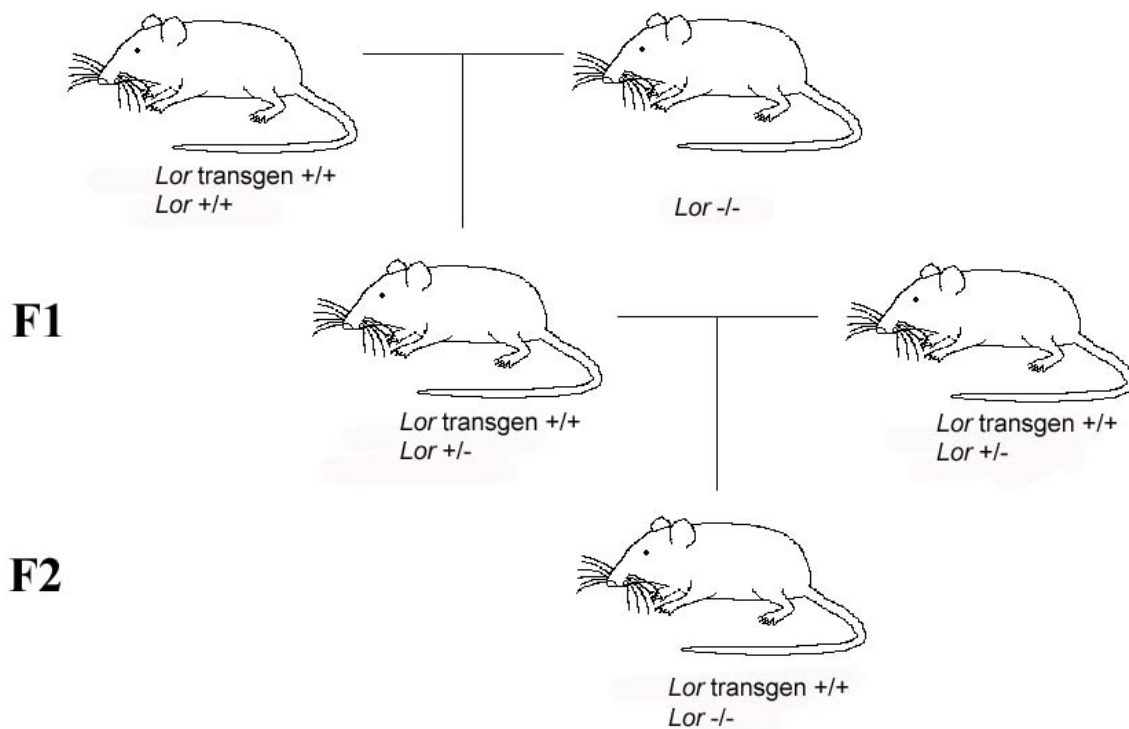


Abb. 2: Paarung transgener Mäuse mit *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen

## 1.5 Palmoplantarkeratosen – ausgewählte Formen

Die im Folgenden beschriebenen Palmoplantarkeratosen (PPK) werden in den Abschnitten 4.1.3 und 4.1.5 dieser Arbeit wieder aufgegriffen.

Palmoplantarkeratosen (PPK) stellen eine heterogene Gruppe von Hautkrankheiten dar, die sich hauptsächlich an Füßen und Händen manifestieren und genetisch bedingt oder exogen verursacht sein können. Besonders die genetisch bedingten Formen werden nach klinischem Aussehen, Vererbungsmodus, Ätiologie, assoziierten Merkmalen und seit einigen Jahren auch nach genetischen Befunden unterschieden. Die hier beschriebenen Formen sind als diffuse hereditäre Palmoplantarkeratosen klassifiziert<sup>20,63</sup>.

### **1.5.1 Epidermolytische und nicht- epidermolytische Palmoplantarkeratose (Vörner-Unna-Thost)**

Die epidermolytische und nicht-epidermolytische Palmoplantarkeratose (OMIM 144200) stellt die häufigste Form der Palmoplantarkeratosen dar. Sie wurde 1880 von Thost<sup>78</sup>, 1883 von Unna<sup>85</sup> und 1901 von Vörner<sup>88</sup> beschrieben. Nach heutiger Auffassung handelt es sich bei allen drei Beschreibungen um den gleichen PPK-Typ<sup>43</sup>. Der Vererbungsmodus erfolgt autosomal dominant. Mutationen wurden hauptsächlich im Gen des Keratins 9 (*KRT9*) auf Chromosom 17 gefunden<sup>43,66,80</sup>. Die Palmoplantarkeratose manifestiert sich innerhalb der ersten Lebensmonate mit diffuser, gelblicher palmoplantarer Hyperkeratose und rotem Randsaum, der an den Rändern scharf abschneidet. Sie ist nicht transgredient [Lat: „transgredi“ – überschreiten, passieren<sup>23</sup>] und somit auf Handflächen und Fußsohlen beschränkt. Typische Komplikationen sind Fissuren, Hyperhidrose und sekundäre Infektionen mit Dermatophyten.

Eine transgrediente und progrediente [Lat: „progredi“ – fortschreitende (der Zeit, dem Alter nach)<sup>23</sup>] Form wurde erstmalig 1952 beschrieben und auch Greithers-Syndrom genannt. Hier finden sich zusätzlich Hyperkeratosen auf Hand- und Fußrückseiten sowie Knien und Ellenbögen<sup>20,44,63</sup>.

### **1.5.2 Palmoplantarkeratose vom Typ Mal de Meleda**

Die PPK Mal de Meleda (OMIM 248300) wurde zuerst 1897 bei Bewohnern der Insel Meleda beschrieben. Der Vererbungsmodus ist rezessiv. Diese PPK beruht auf einer Mutation im SLURP-1-Gen auf Chromosom 8<sup>16</sup>. Mal de Meleda ist transgredient und verläuft meist progredient. Ein Erythem der Handinnenflächen und Fußsohlen entwickelt sich bereits in der Kindheit. Daraus entsteht anschließend eine diffuse Palmoplantarkeratose mit deutlich erythematösem Grund, die sich auf den Rückseiten von Händen und Füßen ausdehnt. Auch auf Ellenbögen und Knien lassen sich Hyperkeratosen finden. Assoziierte Merkmale sind Hyperhidrose, Brachydaktylie, Nagelanomalien und ein periorales Erythem. Auch kardiovaskuläre Anomalien sind gehäuft zu beobachten<sup>20,44,63,83</sup>.

### **1.5.3 Palmoplantarkeratose mit Periodontopathie (Papillon-Lefèvre-Syndrom)**

Die PPK mit Periodontopathie (OMIM 245000) beruht auf Mutationen im Cathepsin-C-Gen (CTSC) auf Chromosom 11<sup>21,79</sup>. Der Vererbungsmodus ist rezessiv, und das klinische Bild der PPK ähnelt dem der PPK Mal de Meleda. Während der Kindheitsphase entwickelt sich zuerst ein Erythem der Handinnenflächen und Fußsohlen. Daraufhin entsteht eine diffuse, oft relativ milde PPK. Die PPK breitet sich transgredient auf Hand- und Fußrücken sowie Ellenbögen und Knien aus. Ein wichtiges Merkmal ist die schwere Gingivitis, welche zum Verlust der Milch- und bleibenden Zähne innerhalb der ersten Lebensdekade führt. Rezidivierende kutane und systemische Pyodermien treten gehäuft auf. Weitere Merkmale können eine milde mentale Retardierung oder Hyperhidrose sein<sup>20,44,63</sup>.

### **1.5.4 Mutilierende Palmoplantarkeratose mit periorifikalen keratotischen Plaques (Olmsted-Syndrom)**

Die mutilierende PPK mit periorifikalen keratotischen Plaques wurde erstmalig 1927 beschrieben<sup>62</sup>. Die Literatur weist zumeist nur sporadische Fälle aus. Das männliche Geschlecht ist überwiegend betroffen<sup>46</sup>. Innerhalb des ersten Lebensjahres entwickelt sich eine symmetrische und scharf begrenzte PPK, die von einem Erythem umgeben ist. Diese PPK führt zu Flexionskontrakturen und tiefen Fissuren, die sehr schmerzhaft für die Betroffenen sind. Es folgen Pseudoainhums und Autoamputationen. Die PPK ist schwer progredient und behindert die Patienten in der gesamten Lebensgestaltung. Das klinische Bild ähnelt dem der PPK der mutilierenden Keratoderma (Vohwinkel-Syndrom) und dem der PPK Mal de Meleda. Ein weiteres Merkmal sind keratotische Papeln, die um Mund, Nase, Genitalien und Anus auftreten. Alopecia universalis und Nagelanomalien treten gehäuft auf. Der Intelligenzquotient ist bei fast allen Patienten normal<sup>20,46,59,63</sup>.

## **1.6 Aspekte der molekularen Humangenetik**

Im Folgenden werden einige für diese Arbeit wichtige molekulargenetische Themenbereiche erläutert.

### **1.6.1 Das Humangenomprojekt**

Die Sequenzierung des gesamten humanen Genoms wurde im April 2003 im Rahmen des Humangenomprojektes abgeschlossen. Weitere Teilaspekte des Humanen Genomprojekts waren und sind die Identifizierung aller Gene und das Aufbereiten der Daten in Datenbanken, die allen Wissenschaftlern zugänglich sind. Solch eine Datenbank wird zum Beispiel am National Center for Biotechnology Information (NCBI<sup>57</sup>) geführt. Durch diese Fortschritte hat sich die Suche nach Genen und Mutationen für genetisch bedingte Krankheiten vereinfacht. Aufwändiges, eigenhändiges Erstellen von genetischen und physikalischen Karten ist häufig nicht mehr notwendig, da alle wichtigen Informationen bereits in Datenbanken zur Verfügung stehen<sup>56</sup>.

### **1.6.2 Vom Phänotyp zur pathogenetischen Mutation**

Bei der Suche nach pathogenen Mutationen wird häufig die Methode des positionellen Klonierens verwandt. Dazu ist es wichtig, eine möglichst kleine chromosomale Kandidatenregion zu definieren. Dies geschieht durch eine genomweite Kartierung betroffener Familien mit Mikrosatelliten (Markern) oder Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). Mikrosatelliten bestehen zumeist aus  $(CA)_n$ -Wiederholungen, welche bei verschiedenen Individuen in unterschiedlicher Länge vorliegen und nach den Mendelschen Regeln vererbt werden. Die mit Hilfe der genomweiten Kartierung gewonnenen Daten können auf Rekombinationsereignisse untersucht und die Rekombinationsfraktion oder -häufigkeit errechnet werden. Letztere stellt ein Maß für die genetische Distanz zweier Loci untereinander dar. Eine Rekombinationshäufigkeit von 1% definiert die genetische Distanz von 1 Centi-Morgan (cM). Die größte Rekombinationshäufigkeit ist 50%, welche eintritt, wenn zwei Loci auf zwei verschiedenen Chromosomen liegen. Je geringer die Distanz zwischen zwei Loci eines Chromosoms ist, desto seltener treten Rekombinationen zwischen diesen Loci auf. Haplotypen stellen die Anordnung der Allele auf einem Chromosom dar.

Durch Computerprogramme können genomweit Lod-Wert- („Logarithm of the odds“)-Analysen durchgeführt und Familienstammbäume auf Kopplung untersucht werden. Der Lod-Wert ist eine Funktion der Rekombinationshäufigkeit. Hierbei spricht ein Lod-Wert von mehr als +3 für eine signifikante Kopplung und ein Lod-Wert von weniger als -

2 gegen eine Kopplung. Die Werte zwischen -2 und +3 sind statistisch nicht eindeutig. Die hierdurch eingegengte Region kann mit Computerprogrammen auf Rekombinationsereignisse untersucht werden.

Ziel dieser Methoden ist es, eine Kandidatengenregion zu definieren. In dieser Region können durch Datenbankrecherche Kandidatengene definiert werden. Hierbei ist es sinnvoll, eine Prioritätenliste dieser Gene zu erstellen. Dazu werden Informationen über die Genexpression, mögliche Funktion sowie Homologien zu anderen Proteinen über Datenbanken recherchiert. Die Kandidatengene werden dann bei Patienten und deren Familienangehörigen sequenziert und auf Mutationen untersucht<sup>74</sup>.

### 1.6.3 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung stellt eine Sequenzierungsmethode dar, welche die Kenntnis der Wildtyp-Sequenz voraussetzt. Es werden Einzelnukleotid-Polymorphismen („Single Nucleotide Polymorphism“; SNP) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Austausch einer einzelnen Base, der gehäuft in der Bevölkerung auftritt und keinen Krankheitswert besitzt.

Die Pyrosequenzierung findet in der Genotypisierung Anwendung. Sie weist eine hohe Sensitivität auf, sodass auch eine quantitative Analyse möglich ist. Hierbei werden beispielsweise für einen heterozygoten SNP die prozentualen Anteile der Basen der beiden Allele bestimmt. Werden auf diese Weise quantitativ Daten von DNA und RNA erhoben und verglichen, können somit Unterschiede in der Expression auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die Pyrosequenzierungsmethode beruht auf folgenden Reaktionen (Abb. 3):

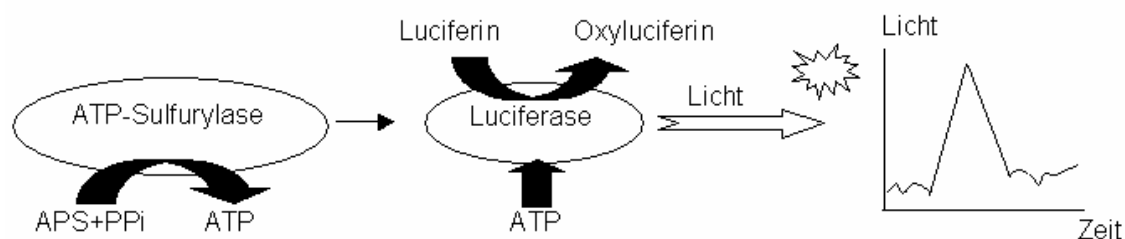


Abb. 3: Das Prinzip der Pyrosequenzierung

Ein Sequenzprimer hybridisiert an einen DNA-Einzelstrang, der zuvor mittels PCR amplifiziert und vom komplementären Strang getrennt wurde. Diese Einzelstränge und die Primer werden mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie den Substraten Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Luciferin inkubiert. Die dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) werden einzeln in vorgegebener Reihenfolge hinzu gegeben. Das erste dNTP wird durch die Polymerase an den Primerstrang eingebaut, wenn es sich als komplementär zum DNA-Einzelstrang erweist. Hierbei erfolgt eine Freisetzung von Pyrophosphat (PPi). Die Menge Pyrophosphat ist equimolar zu den eingebauten Nukleotiden.

Im nächsten Schritt erfolgt eine quantitative Umwandlung von Pyrophosphat und APS durch die ATP-Sulfurylase in ATP, welches die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin mit Hilfe der Luciferase induziert. Dieser Vorgang produziert sichtbares Licht, welches von einer Kamera registriert und in einen „peak“ (Signal) im Pyrogramm umgewandelt und dargestellt wird. Das erzeugte Licht ist proportional zur ATP-Menge und somit auch proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Die Apyrase baut kontinuierlich die nicht eingebauten Nukleotide ab. Wenn der Abbau vollständig erfolgt ist, wird das nächste dNTP hinzu gegeben, sodass langsam der Aufbau des komplementären DNA-Strangs erfolgt<sup>65</sup>.

## 1.7 Zielsetzung

Die Hauptziele dieser Arbeit bestanden darin, (1) die ursächliche Mutation in einer Familie mit der ursprünglichen Verdachtsdiagnose autosomal dominante lamelläre Ichthyose (MDC-804) zu suchen, (2) eine Standarddiagnostik zu etablieren sowie (3) eine Expressionsanalyse mit Pyrosequenzierung durchzuführen.

Zu (1)

Im Vorfeld dieser Arbeit hatte bereits eine genomweite Kartierung für fünf Familien (MDC-804, B-4555, B-4565, B-4571 und B-4601) mit autosomal dominanter lamellärer Ichthyose stattgefunden. Daher sollte zu Beginn dieser Arbeit mit Hilfe dieser bereits vorliegenden Daten eine Haplotypisierung in der Familie MDC-804 manuell durchgeführt werden. Danach war eine Feinkartierung geplant, um die Kandidatengenregion weiter einzuengen. Wie in Abschnitt 1.6.2 beschrieben, sollte eine Datenbankrecherche vorgenommen werden, um geeignete Kandidatengene zu definieren.

Diese Kandidatengene sollten in der Familie MDC-804 auf Mutationen untersucht werden. Nach Mutationsfund war angedacht, auch die anderen vier Familien auf Mutationen in dem entsprechenden Gen zu überprüfen. Danach sollten die klinischen Merkmale des Krankheitsbildes anhand der untersuchten Familien zusammengefasst und in einen Bezug zu gefundenen Mutationen gesetzt werden.

Zu (2)

Ein zweites Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer Standarddiagnostik für das Gen, in welchem Mutationen gefunden wurden. Dazu sollte die Untersuchung von DNA- und RNA-Material miteinander verglichen werden. Ein weiterer Schritt bestand darin, dieses Verfahren bei Proben von verschiedenen weiteren Patienten diagnostisch anzuwenden und damit zu etablieren.

Zu (3)

Der dritte Abschnitt bestand aus einer Expressionsanalyse auf RNA-Ebene. Hierbei sollte die noch relativ neue Pyrosequenzierungsmethode Anwendung finden. Dafür war es notwendig, in mindestens einer betroffenen Person einen passenden heterozygoten SNP ausfindig zu machen. In dem Bereich dieses SNPs sollten cDNA und DNA quantitativ sequenziert werden, um etwaige Expressionsunterschiede auf RNA-Ebene aufzudecken. Hierzu sollte RNA zur cDNA-Gewinnung extrahiert werden. Darüber hinaus sollten diese Ergebnisse in den Stand der Forschung eingebunden werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien stammen von der Firma Merck.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
1 kb Leiter	Invitrogen
10x MegaBACE™-LPA-Puffer	Amersham Pharmacia Biotech Inc
10x NH <sub>4</sub> -Reaktion-Puffer incl 15 mM MgCl <sup>++</sup> , pH 8,8	Invitek
10x NH <sub>4</sub> -Reaktion-Puffer ohne Mg <sup>++</sup> , pH 8,8	Invitek
3730 „Running“-Puffer mit EDTA [10x]	Applied Biosystems
3730 POP-7™ Polymer	Applied Biosystems
Agarose	Invitrogen
Betain-Monohydrat	Fluka
Big Dye® Terminator v1.1,3.1	
5xSequenzierungspuffer	Applied Biosystems
Dimethylsulfid (DMSO)	Stigma
Dithiothreitol (DTT)	Promega
DNase RNase frei	Roche
dNTP-Mix	Bioline
EDTA 0,5M pH 8	Roth
Essigsäure 96%	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Exo	Biolabs



Ficoll	Sigma
Formamid	Amersham Biosciences
Hexamere	Pharmacia
Magnesiumdichlorid (MgCl <sup>++</sup> )	Invitek
MegaBACE ET 400/550-R Size Standard	Amersham Biosciences
MegaBACE „Long-Read Matrix“	Amersham Biosciences
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
M-MLV RT 5x Puffer	Promega
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Orange G	Sigma
Primer	Biotez
Proteinase K	Roche
„RNA later RNA Stabilization Reagent“	Qiagen
RNase-Inhibitor	Pharmacia Biotech
SAP	Promega
„Single stranded binding protein“ (SSBP)	Promega
„Smart Ladder“ Größenstandard	Eurogentec
Streptavidin Sepharose™ „High Performance“	Amersham Biosciences
Taq Polymerase	Invitek
Tris	Roth
Tween-20 (10%)	Pierce
β-Mercaptoethanol	Sigma

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

	Inhalt
AB-Puffer, (pH 7,6) 1x	20 mM Tris 2 mM Magnesium-Acetat-Tetrahydrat
BW-Puffer (pH 7,6) 2x	10 mM Tris 2 M NaCl 1 mM EDTA 0,1% Tween 20
Orange G Stoppmix	0,25% Orange G 15 g Ficoll 10 mM EDTA
TAE 1L	242 g Tris 57 ml Essigsäure 96% 100 ml EDTA 0,5M pH8
Waschpuffer (pH 7,6) 1x	10 mM Tris

### 2.1.3 Kits

Kits	Hersteller
„Big Dye® Terminator v1.1 Sequencing Standart Kit“	Applied Biosystems
„Gene Clean III Kit“	Bio 101
„Invisorb Spin DNA Extraction Kit“	Invisorb

„Millipore Amicon®Microcon®-PCR Centrifugal Filter Devices“	Millipore
„Millipore Montage Seq96 Sequencing Reaction Cleanup Kit“	Millipore
„Millipore Ultrafree®-DA DNA Extraction from Agarose Gels“	Millipore
„PSQ HS 96 Nucleotide Dispensing Tips“	Pyrosequencing™
„PSQ HS 96 Reagent Dispensing Tips“	Pyrosequencing™
„PSQ HS 96 Sample Prep Thermoplate Kit“	Pyrosequencing™
„PSQ HS SNP Reagent Kit“	Pyrosequencing™
„RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit“	Qiagen
„RNeasy® Protect Mini Kit“	Qiagen
„Triple Master™ PCR-System“	Eppendorf

#### 2.1.4 Gebrauchsmaterialien

	<b>Hersteller</b>
„96 Skirted Reaction plate“	Corning Incorporated Costar®
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
PSQ™ 96 – Platten und PSQ™ HS 96 - Platten	Pyrosequencing™
Reaktionsgefäße (500µl, 1000µl, 1500µl, 2000µl)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (8-tube Strips 0,2 ml)	Biozym
„Strips“	Biozym
Thermodruckpapier (K65HM- <sub>CE</sub> / KP65HM- <sub>CE</sub> )	Mitsubishi
Thermo-Fast® 96 „Detection Plate“	ABgene
„Thermowell 96 well plate“	Corning Incorporated Costar®

### 2.1.5 Geräte

	Hersteller
ABI PRISM 3730 DNA Analysierer	
„96 well plate retainer, septa seal“	
„96 well plate base, septa seal“	
„3730 Capillary Array“	Applied Biosystems
Dokumentationsystem, UV Photographie	Herolab
„Electrophoresis Power Supply“ EPS 200	Pharmacia Biotech
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Finnpipette® 50-300l und 5-50	Thermo Labsystem
Horizon ® 11.14 Elektrophoresekammer	Life Technologies™
Megabase 1000 DNA „Analysis System“	Amersham&Lifescience
Mikrowelle M1712N	Samsung
MJ Research PTC 225 „Peltier Thermal Cycler“	Biozym
„Monoshake“; Schüttler	Variomag®
„MS Minishake“r; Vortexer	IKA®
Pipetten 2µl, 20µl, 200µl, 1000µl	ABI; Eppendorf; Gilson
PSQ HS 96A System Sequenzierautomat	Pyrosequencing™
Thermodrucker Model P68E	Mitsubishi
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
ULTRA-THURROX®T25 basic; Homogenisator	IKA®
UV Transluminator UVT-28MP	Herolab
„Vakuum Manifold“	Millipore
Vacuum Prep Workstation, Aufreinigungsstation	Pyrosequencing™
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Instruments

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist in der Molekulargenetik ein Standardverfahren zur Vervielfältigung (Amplifikation) eines bestimmten DNA-Abschnittes mittels Primer und DNA-Polymerase. Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Schritten: Zuerst wird in einem Denaturationsschritt der Doppelstrang getrennt, im folgenden Annealingschritt binden die Primer an die DNA. Im Elongationsschritt synthetisiert die DNA-Polymerase aus Nukleotiden (dNTPs) einen neuen Komplementärstrang.

#### 2.2.1.1 Primerdesign

Außer den bekannten Mikrosatellitenprimern D1S1653, D1S2771 und D1S2635 wurden die Primer mittels Primer 3<sup>64</sup> auf der Grundlage der in NCBI<sup>57</sup> publizierten *LOR*-Sequenz ausgewählt. Nur zur Generierung des Sequenzprimer LOR\_SNP für die Pyrosequenzierung wurde die SNP-Primer-Design-Software AB Version 1.0.1 verwandt. Um eine erfolgreiche Amplifikation der Primer zu ermöglichen, wurden die Primer nach folgenden Eigenschaften ausgewählt:

- Annealing-Temperatur zwischen 50°C und 65°C
- Annealing-Temperaturen der zusammen gehörenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit annähernd identischer Annealing-Temperatur
- CG-Gehalt der Primer zwischen 40% und 65%
- Primerpaare mit möglichst wenigen 3' und 5' Interaktionen untereinander oder der einzelnen Primer mit sich selbst

Die Primer wurden zur Kontrolle mit Blast (n) „Basic Local Alignment Search Tool“<sup>7</sup> gegen die gesamte Datenbank abgeglichen. Alle Primer wurden bei Biotex bestellt.

Tabelle 1: verwendete Primer

Name	Sequenz
LOR_A_F	CAGGGGAATGAGGAACTCAA
LOR_B_F	AGTGGACTGCGTGAAGACCT
LOR_AC_F	TCGGTAGCAGCGGTTCTGG
LOR_P_F	GTGGGAGCGTCAAGTACTCC
LOR_C_F	TGGGAGCGTCAAGTACTCC
LOR_SNP	GGAGCGTCAAGTACTCC
LOR_AC_R	CCACCGCTGGAGAAACAG
LOR_3_F	CGGTCCAGTGCCAGAGCTA
LOR_P_Bio_R	CGTAGCTCTGGCACTGGAC
LOR_D_F	CGCAGCAGGTCACTCAGAC
LOR_7_R	CCTCCAGAGGAACCACCTC
LOR_A_R	CAAACCTCGGGTAGCATCA

#### 2.2.1.2 PCR mit Temperaturgradienten

Mit Hilfe eines Temperaturgradienten von 53-63°C wurde versucht, die Annealingbedingungen zu optimieren, da sich diese bei den einzelnen Primerpaaren häufig unterscheiden.

Bedingungen Temperaturgradienten-Programm 53-63°C:

1. Aktivierung: 3 min bei 95°C
2. Denaturierung: 30 sec bei 95°C
3. Annealing: 45 sec mit einem Temperaturgradienten: 53°C; 53,3°C; 53,9°C; 54,7°C; 55,8°C; 57,3°C; 59°C; 60,7°C; 61,5°C; 62,3°C; 62,8°C; 63°C
4. Elongation: 45 sec bei 72°C
5. Wiederholen der Schritte 2-4 für 35 Zyklen
6. 20 min bei 72°C

### 2.2.1.3 Touchdown-PCR für die Feinkartierung

Zur Feinkartierung wurden bekannte Mikrosatelliten verwandt. Die Rückwärtsprimer von D1S1653 und D1S2771 waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert und der Rückwärtsprimer von D1S2635 mit HEX.

Ein 10 µl Ansatz enthielt 8 ng DNA, 1x PCR-Puffer, je 250 pmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 3,5 nmol von jedem Primer und 0,35 U Taq. Einem erstellten Mastermix aus dH<sub>2</sub>O, Primern, NH<sub>4</sub>-Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub>, dNTPs und Primern wurde erst unmittelbar vor dem Pipettieren auf die DNA die Taq-Polymerase hinzugefügt, um nicht frühzeitig unspezifische Bindungen zu erhalten. Der Primer D1S2771 wurde mit bewährter Annealing-Temperatur von 53°C mit einer Touchdown-PCR vervielfältigt. Für die Primer D1S2635 und D1S1653 ergab sich anhand einer Temperaturgradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur von 55°C, die als Grundlage der Touchdown-PCR diente.

Bedingungen Touchdown-Programm x=53 oder 55°C

1. Aktivierung: 3 min bei 95°C
2. Denaturierung: 30 sec bei 95°C
3. Annealing: 45 sec bei x+6/x+4/x+2/x°C in den ersten 4 Zyklen je 2°C abwärts
4. Elongation: 45 sec bei 72°C
5. Wiederholen der Schritte 2-4 mit x°C Annealing Temperatur für weitere 31 Zyklen
6. 20 min bei 72°C

### 2.2.1.4 PCR zur Sequenzierung

Die PCR-Programme wurden selbst entworfen. Ein 12,5 µl Ansatz enthielt 8 ng DNA, 1x NH<sub>4</sub>- Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub>, je 312,5 pmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 nmol von jedem Primer, 5% DMSO und 0,325 U Taq. Einem Mastermix aus dH<sub>2</sub>O, Primern, PCR-Puffer, 5%DMSO, dNTPs und Primern wurde erst unmittelbar vor dem Pipettieren auf die DNA die Taq-Polymerase hinzugefügt, um auch hier nicht frühzeitig unspezifische Bindungen zu erhalten.

Bedingungen Progr5895:

1. Aktivierung: 3 min bei 95°C
2. Denaturierung: 30 sec bei 95°C
3. Annealing: 1 min bei 58°C
4. Elongation: 1 min bei 72°C zur

5. Wiederholen der Schritte 2-4 für weitere 33 Zyklen
6. 20 min bei 72°C

#### 2.2.1.5 PCR zur cDNA-Testung (LOR\_C)

Hier wurde der gleiche wie unter Abschnitt 2.2.1.4 aufgeführte Ansatz verwandt. Auch das PCR-Programm Progr5695 folgte wie unter Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben. Allerdings wurde hier die Annealing-Temperatur des Schrittes 3 von 58°C auf 56°C geändert. Daher hieß dieses Programm Progr5695.

#### 2.2.1.6 PCR zur RNA-Extraktionskontrolle (G6P)

Die Primer, der Ansatz und die PCR-Bedingungen wurden einem Standardprotokoll für das Glukose-6-Phosphatase-Gen (G6P) entnommen. Ein 10 µl Ansatz enthielt 2 µl cDNA, NH<sub>4</sub>- Reaktionspuffer mit MgCl, je 625 pmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5nmol von jedem Primer, 5% DMSO und 0,5 U Taq. Einem Mastermix aus dH<sub>2</sub>O, Primern, PCR-Puffer, 5% DMSO, dNTPs und Primern wurde erst unmittelbar vor dem Pipettieren auf die cDNA die Taq hinzugefügt, um nicht frühzeitig unspezifische Bindungen zu erhalten.

Bedingungen ProgrG6P:

1. Aktivierung: 5 min bei 95°C
2. Denaturierung: 30 sec bei 95°C
3. Annealing: 45 sec bei 57°C
4. Elongation: 1 min bei 72°C
5. Wiederholen der Schritte 2-4 für weitere 32 Zyklen
6. 20 min bei 72°C

#### 2.2.1.7 PCR zur Pyrosequenzierung

Ein 25 µl Ansatz enthielt 3 µl (12 ng) DNA oder 6 µl cDNA, 1x NH<sub>4</sub>- Reaktionspuffer ohne MgCl<sub>2</sub>, 75 nmol MgCl<sub>2</sub>, je 1,25 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 3nmol von jedem Primer, 25 µmol Betain-Monohydrat und 1 U Taq. Einem Mastermix aus dH<sub>2</sub>O, Primern, PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Betain-Monohydrat, dNTPs und Primern wurde erst unmittelbar vor dem Pipettieren auf die cDNA die Taq Polymerase hinzugefügt.



Bedingungen Progr6495:

1. Aktivierung: 5 min bei 95°C
2. Denaturierung: 30 sec bei 95°C
3. Annealing: 45 sec bei 64°C
4. Elongation: 2 min bei 72°C
5. Wiederholen der Schritte 2-4 für weitere 45 Zyklen
6. 5 min bei 72°C

## **2.2.2 DNA-Nachweismethode**

### **2.2.2.1 Agarose-Gele**

Gele mit 2% Agarose dienten der Überprüfung der PCR. Zur Aufreinigung des PCR-Produkts wurden Gele mit 1% Agarose verwandt. Dazu wurden 1 g (1%ige) oder 2 g (2%ige) Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und gelöst. Anschließend wurden 10 µl Ethidiumbromid (5mg/ml) hinzu pipettiert. Das flüssige Produkt wurde in vorgefertigte Kammern mit Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämmen gezogen und die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt. 2 µl des PCR-Produkts wurden mit 3 µl Orange-G-Stoppmix vermischt und in die entstandenen Taschen pipettiert. Als Standard liefen entweder 2,5 µl „Smart-Ladder“-Marker oder 3 µl KB-Leiter mit. Je nach Größe des Gels wurde die Kammer für etwa eine Stunde an eine Spannung von 100-130 Volt geschlossen. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

### **2.2.2.2 MegaBACE**

Zur Genotypisierung wurden 4 µl Verdünnung mit 4 µl Größen-Standard („MegaBACE ET 400/550-R Size Standart“) per Hand in eine „96-skirted-Reaction“-Platte pipettiert. Die sechs Röhrchen MegaBACE „Long-Read Matrix“ wurden vor Benutzung für 4 min bei 20°C bei 4000 x g zentrifugiert. Eine separate „96-skirted-Reaction“-Platte wurde mit 98 µl 1x MegaBACE™ LPA-Puffer auf Raumtemperatur erwärmt. Da nur die Farbstoffe FAM und HEX zur Anwendung kamen, wurde am MegaBACE nur das Filterset „Dye Set1“ und somit auch nur die Software „Genotyping 1“ verwendet. Die in der Software voreingestellten Parameter wurden nicht verändert. Die Proben wurden 50 sec bei 95°C denaturiert, und danach wurde den Anweisungen des Gerätes gefolgt. Die Ladeplatte

wurde nach der Probeninjektion verworfen. Zur Auswertung erfolgte die Eingabe der auszuwertenden Marker mit Namen, Produktgröße und Motivlänge in eine Markerdatei des Programms „Genetic Profiler“. Die Rohdaten wurden mit der Software „Genetic Profiler“ sowie den zusätzlichen Informationen aus der Marker-Datei, des Big-Dye-Sets, der Matrix und der MegaBACE-Typisierung in Genotypen umgewandelt.

#### **2.2.2.3 ABI 3730**

3730-„Running-Puffer“ und 3730 POP-7™-Polymer wurden morgens für sämtliche Platten des Tages geladen. Die Thermo-Fast® 96 „Detection Plate“ wurde mit einem Septum bedeckt und in die Plattenvorrichtung gesetzt („plate base and plate retainer“). Das „Sample-sheet“ wurde als plt-file gesichert und in die ABI 3730-Software geladen. Es wurde in der Software angegeben, dass die Big Dye Version 1.1 verwandt wurde und dass es sich um lange Sequenzen handelte.

Zur Auswertung wurden die Rohdaten mit der Software „DNA star“ Version 5.0 automatisch bearbeitet. Die vorgegebenen Daten wurden nicht verändert und anschließend wurden die gewonnenen Sequenzen in Seq Man™ II Version 5.05 ausgewertet.

### **2.2.3 Sequenzierung**

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf der Kettenabbruchmethode. Die entstandenen Segmente verschiedener Länge werden im Kapillarsequenzierer aufgetrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe im Laserstrahlengang aufgezeichnet. Anschließend wird daraus die Nukleotidreihenfolge errechnet.

#### **2.2.3.1 PCR – Aufreinigung**

Das PCR-Produkt wurde anhand des Agarose-Gels überprüft, enzymatisch mit 1,8 U Exo I und 0,32 U SAP für 30 min bei 37°C und 15 min bei 72°C inkubiert und aufgereinigt.

#### **2.2.3.2 Sequenzreaktion**

Das Programm zur Sequenzreaktion wurde selbst etabliert. Ein 10 µl Ansatz enthielt 0,5 µl Big Dye.1, 1x Big Dye® Sequenzierungspuffer, 1,25 nmol Primer und 2 µl aufgereinigtes PCR-„Template“.

Bedingungen der Sequenzreaktion:

1. 5 min bei 98°C
2. 10 sec bei 96°C
3. 5 sec bei 55°C
4. 4 min bei 60°C
5. Wiederholen der Schritte 2-4 für weitere 29 Zyklen

#### *2.2.3.3 Aufreinigung des Sequenzierproduktes*

Zur Aufreinigung des Sequenzierproduktes kam das Millipore Montage Seq96 „Sequencing Reaction Cleanup Kit“ zur Anwendung. Hierbei wurde ein mitgelieferte „96 well SEQ plate“ auf das „Vakuumfold“ platziert und 5 µl Sequenzierprodukt in die „wells“ pipettiert. Nach der Zupipettierung von 20 µl „injection solution“ wurde für etwa 3 min ein Vakuum von 20 inHg angelegt. Weitere 25 µl „injection solution“ wurden hinzu gegeben und wieder für 3 min durch Anlegen eines Vakuums abgesaugt. Nach der Resuspendierung mit 25µl „injection solution“ wurde das Produkt in der vorhandenen Platte 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte die Überführung in eine Thermo-Fast® 96 „Detection Plate“, in die vorher 10 µl dH<sub>2</sub>O hinein pipettiert wurden.

### **2.2.4 RNA-Extraktion**

#### *2.2.4.1 Probengewinnung*

Das Blut wurde venös gewonnen, sofort mit Trizol gemischt und in Eis transportiert.

Die Haarwurzeln entstammten der Kopfhaut. Sie wurden sofort in „RNA-later RNA Stabilization Reagent“ gegeben.

Die Hautprobe zur Etablierung der Methode entstammte dem Überschuss der Nävuszellnävus-Extraktion der Autorin am Oberschenkel. Die Hautprobe der Patientin wurde nach erfolgtem Einverständnis am Handgelenk durch Abschürfen an der Epidermis-Dermis-Grenze gewonnen, damit keine Narben entstehen konnten. Auch die Hautprobe wurde nach Gewinnung sofort in RNA-later „RNA Stabilization Reagent“ gegeben.

#### *2.2.4.2 RNA- Extraktionsprotokoll aus Blut*

Zu 1 ml frischem EDTA-Blut wurden 10 ml Trizol gegeben und stark gevortext. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von 5 min wurden 2 ml Chloroform hinzu gegeben und bei 4°C für 15 min bei 12,000 x g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren der oberen Schicht und Mischung mit 5 ml Isopropanol erfolgte die Inkubierung für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben bei 4°C für 10 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit mindestens 75% Ethanol gewaschen. Nach 5 min Zentrifugieren bei 4°C und 7500 x g wurde die Flüssigkeit abdekantiert und das Pellet getrocknet. Zum Auflösen fanden 50 µl DEPC-Wasser (RNase freies Wasser) Verwendung. Anschließend wurde die RNA sofort weiterverarbeitet und der Rest bei –20°C gelagert.

#### *2.2.4.3 RNA-Extraktionsprotokoll aus Haaren*

Zur RNA-Extraktion aus Haarwurzeln wurde das „RNeasy® Protect Mini Kit“ von Qiagen verwandt. Analog dem Protokoll wurden 10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml der Lösung RTL pipettiert. In 350 µl dieses Gemisches wurden ca. 25 Haarwurzeln gegeben, intensiv gevortext und danach 3 min bei >8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in 350 µl 70%igen Ethanol gegeben und anschließend auf eine Qiaquick Säule aufgebracht. Diese Säule wurde 15 sec bei >8000 rpm zentrifugiert. Der Ausfluss wurde verworfen, 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 sec bei > 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt und die Säule zum Trocknen für 2 min bei >8000 rpm zentrifugiert. Zur Elution des Produkts wurden 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und für 1 min bei >8000 rpm ebenfalls zentrifugiert. Danach erfolgte die sofortige Weiterverarbeitung der RNA und die Lagerung des Restes bei –20°C.

#### *2.2.4.4 RNA-Extraktionsprotokoll aus Haut*

RNA-Extraktion aus Haut mit „RNeasy® Protect Mini Kit“ von Qiagen

Teil 1:

In 297 µl RTL-Puffer mit 3 µl β-Mercaptoethanol wurden ca. 30 mg Gewebe homogenisiert und 590 µl ddH<sub>2</sub>O und 0,2 mg Proteinase K hinzu pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 55°C wurde der Ansatz für 3 min bei 10000 x g bei 22°C zentrifugiert. Anschließend konnten 900 µl des Überstandes abpipettiert und mit 450 µl 96% Ethanol aufgefüllt werden.

## Teil 2:

700 µl des Ansatzes wurden auf eine Säule gegeben und 15 sec bei >10000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und eine Wiederholung des Schrittes mit dem restlichen Ansatz durchgeführt. Danach wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und wieder 15 sec bei >10000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte eine zweimalige Wiederholung des Vorgangs mit 500 µl PRE-Puffer. Nur bei der letzten Wiederholung dauerte die Zentrifugation 2 min. Zum Eluieren wurden 30 µl RNase freies Wasser direkt in die Silica-Gel-Membran der Säule pipettiert und 1 min bei > 10000 rpm zentrifugiert. Die Wiederholung des Schrittes erfolgte in einem zweiten Gefäß. Danach wurde die RNA sofort weiterverarbeitet und der Rest bei –20°C gelagert.

## RNA Extraktion aus Haut mit „RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit“ von Qiagen

Bis zu 100 mg Gewebe wurden in 1 ml „QIAzol Lysis Reagent“ homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz 15 sec intensiv geschüttelt und für weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren des Ansatzes bei 4°C bei 12000 x g für 15 min. Die wässrige Phase (ca. 600 µl) konnte abpipettiert und mit 600 µl 70% Ethanol aufgefüllt werden. Das weitere Vorgehen folgte dem Teil 2 des obigen Haut-Extraktionsprotokolls.

### 2.2.4.5 Reverse-Transkriptase-PCR (RT – PCR)

Mittels RT-PCR ließ sich aus mRNA durch Reverse Transkriptase cDNA herstellen. Die „Random“-Hexamere dienten als Primeräquivalent. In einer anschließenden PCR wurde der spezifisch zu untersuchende Nukleinsäure-Abschnitt der cDNA amplifiziert. Teilweise wurde die RNA vor Benutzung mit 1U „DNase RNase free“ sowie 6,25 U RNase-Inhibitor für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ansonsten wurde die RNA sofort weiterverarbeitet. Ein 10 µl Ansatz enthielt nach Möglichkeit 100-150 ng RNA, 2,5 nmol je dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 97 pmol Hexanucleotidmischung, 6,25 U RNase-Inhibitor, 100 pmol DTT und 200 U Reverse Transkriptase mit RT-Reaktions-Puffer. Der Ansatz wurde mit dem doppelten Volumen durchgeführt und für 5 min bei 56°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Danach erfolgte die Abkühlung des Ansatzes mittels Eisbad und dessen Halbierung. Der einen Hälfte wurde 200 U Reverse Transkriptase und der anderen Hälfte als Kontrolle 1 µl DEPC-Wasser hinzugefügt.

Diese Kontrollprobe diene in den folgenden Schritten als Kontrolle einer möglichen DNA-Kontamination der Probe. Beide Ansätze wurden für 10 min bei 20°C, für 40 min bei 42°C und für 6 min bei 98°C inkubiert.

### **2.2.5 Pyrosequenzierung**

Pyrosequenzierung ist eine DNA-Sequenzierungstechnik, die zur SNP-Genotypisierung benutzt werden kann. Aufgrund der Sensitivität der Methode eignet sich diese besonders zur Quantifizierung zweier Allele eines Gens. Für die quantitative Analyse der Expression der beiden Allele des Loricrin-Gens wurde hier das PSQ™ HS 96A System von „Pyrosequencing“ verwendet (Abschnitt 1.6.3).

#### *2.2.5.1 Aufreinigung der PCR-Produkte aus einem Agarose-Gel*

Die Gelaufreinigung erfolgte mit einem 1%igem Agarose-Gel. Das gesamte PCR-Produkt wurde mit 6 µl Orange G versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Unter UV-Licht wurde die Produktbande sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in das Millipore Ultrafree®-DA Aufreinigungsgefäß gegeben. Bei der Zentrifugation für 10 min bei 5 000 x g wurde das Agarose-Gelstück vernebelt und das PCR-Produkt gereinigt.

#### *2.2.5.2 Einzelstrangisolierung für die Sequenzreaktion*

Nach der Kontrolle der PCR mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (Abschnitt 2.2.2.1) erfolgte die Immobilisierung der Biotin-markierten PCR-Produkte. Dazu wurden ein Gemisch aus 38 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl Streptavidin Sepharose™, 40 µl 2x BW-Puffer in eine PSQ™96 – Platte gegeben und mit 20 µl PCR-Produkt versetzt. Die Platte wurde 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Separation der Einzelstränge erfolgte mit der Vakuum-Aufreinigungsstation von Pyrosequencing. Mittels eines „Vakuum Prep Tool“ mit 96 Filtersonden wurden nun die „Sepharose-Beads“ mit den daran immobilisierten PCR-Strängen aus dem PCR-Ansatz gefiltert und blieben während der folgenden Reinigungsschritte an diese Filterstation gebunden. Zur Separation der Einzelstränge wurden die Produkte zuerst 5 sec in 70% Ethanol gewaschen, dann 5 sec in 0,2 M NaOH denaturiert und 7 sec im Wasch-Puffer gespült. Nach Abschalten des Vakuums lösten sich die DNA-Einzelstränge in einer PSQ™ HS 96-Platte in 12 µl Sequenzierpuffer und 3,6 nmol Sequenzierprimer von den

Filtersonden. Dieser Ansatz wurde 2 min bei 85°C inkubiert und anschließend zur Primeranlagerung auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### *2.2.5.3 Pyrosequenzierung*

Zur Quantifizierung der beiden Allele des Loricrin-Gens ließ sich das PSQ™ HS 96A-System verwenden. Die Sequenzreaktion erfolgte mit den „PSQ HS 96 Nucleotide“ und „PSQ HS SNP Reagent Kits“. Proben, die nicht mittels Agarose-Gel-Extraktion aufgereinigt worden waren, wurden mit 900 ng „Single stranded binding protein“ (SSBP) versetzt. Die Eingabe der Reihenfolge der Zugabe der Desoxynukleotide „Dispensation order“ während der Reaktion erfolgte zuvor manuell in die PSQ HS 96A-Software Version 1.1. Diese Software berechnete ebenfalls nach der Reaktion die Häufigkeiten, mit der die beiden Allele des Gens vorlagen.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Feinkartierung

### 3.1.1 Bereits vorhandene Forschungsergebnisse

Im Vorfeld dieser Arbeit hatte bereits eine genomweite Kartierung mehrerer Familien mit der Verdachtsdiagnose autosomal dominante lamelläre Ichthyose (ADLI) stattgefunden. Das betraf die Familien MDC-804, B-4555, B-4565, B-4571 und B-5601. Die Familie MDC-804 stammte aus dem Institut für Medizinische Genetik, Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die anderen vier Familien stammten aus der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten, Universität Münster.

Die folgenden klinischen Befunde wurden dem dermatologischen Befund der Familie MDC-804 entnommen. Der Vererbungsmodus dieser Familie verlief nach vorliegendem Stammbaum eindeutig autosomal dominant. Die Hautbefunde zeigten eine generalisierte leichte Ichthyose mit zonierter, sehr starker Lichenifikation. Die Handinnenflächen und Fußsohlen wiesen eine deutliche Hyperkeratose auf. Darüber hinaus gaben alle Patienten an, als Kollodiumbaby geboren worden zu sein. Eine autosomal dominante lamelläre Ichthyose wurde erstmalig von Traupe und Mitarbeitern bei der hier auch untersuchten Familie B-4601 beschrieben<sup>84</sup>.

Die im Vorfeld dieser Arbeit erfolgte Genotypisierung der Familie MDC-804 hatte genomweit im Bereich des Markers bei D1S498 den maximalen Lod-Wert von 2,8 ( $\theta = 0$ ) ergeben. Der erwartete Lod-Wert betrug 2,603. Die Genotypisierung sowie die Lod-Wert-Berechnung wurden nicht durch die Autorin selbst vorgenommen<sup>77</sup>.

### 3.1.2 Haplotypisierung und Feinkartierung

Die vorausgegangene Lod-Wert-Berechnung diente als Grundlage zur Einengung der Kandidatengenregion. Mithilfe der Marker D1S200 bis D1S431 im Bereich von 100cM wurden manuell Haplotypen der zuvor beschriebenen Familie MDC-804 erstellt, um Rekombinationsereignisse zu definieren. Aus den erstellten Haplotypen ergaben sich informative Rekombinationsereignisse. Diese lagen in Centromer-Richtung bei Patientin 20 zwischen den Markern D1S221 und D1S502. In Telomer-Richtung befanden sie sich bei Patient 14 zwischen D1S506 und D1S484. Das ergab einen Bereich von 27,44 cM. Die Datenbankrecherche ergab weitere drei Marker in dem Abschnitt zwischen D1S506



und D1S484. Mit diesen drei Markern wurde eine Feinkartierung bei 13 Mitgliedern der Familie MDC-804 vorgenommen. D1S2771 ließ sich ohne Probleme mit dem Standardprotokoll der Touchdown-PCR amplifizieren. Für die Marker D1S2635 und D1S1653 musste erst anhand einer Temperaturgradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur bestimmt werden, welche bei 55°C lag. Anschließend konnten dann diese Marker ebenfalls mit dem Standardprotokoll der Touchdown-PCR amplifiziert werden. Die Ergebnisse zeigten eine detailliertere Feinkartierung der Familie MDC-804.

Bei Patient 14 standen DNA-Proben der Eltern nicht zur Verfügung, da diese bereits verstorben waren. Bei seinem Halbbruder (Patient 9), seiner Schwester (Patientin 16) sowie seiner Tochter (Patientin 18) ergaben sich für die Marker D1S1653 und D1S2635 heterozygote Genotypen (Abb. 4). Der Vergleich der Genotypen der Geschwister (Patient 9, 14 und Patientin 16) untereinander deckte bei Patient 14 eine Rekombination auf. Der rekombinierte Haplotyp wurde an seine Tochter (Patientin 18) weitervererbt (Abb. 4). Dadurch konnte in der Region zwischen D1S1653 und D1S2635 bei Patient 14 auf ein Rekombinationsereignis geschlossen werden. Damit war die informative Aussage der Feinkartierung erschöpft, da keine weiteren Marker zur Verfügung standen. Der neu eingegrenzte Bereich betrug somit 23,38 cM<sup>19</sup>.



### 3.1.3 Kandidatengensuche

Die Suche nach Kandidatengenen wurde im Bereich zwischen D1S221 und D1S2635 vorgenommen. Zwischen den Markern D1S498 und D1S305 befindet sich die Region des epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC). In dieser Region liegen viele wichtige Gene, die für den Aufbau des „cornified envelopes“ CE verantwortlich sind. Daher ist dieser Bereich unter funktionellen Gesichtspunkten eine sehr interessante Kandidatenregion für Hautkrankheiten. Genetische und physikalische Karten sind für diesen Bereich schon 1996 erstellt worden<sup>51</sup>. Zur Kontrolle wurden diese Ergebnisse mit den Daten des Humangenomprojektes in der NCBI-Datenbank mit der Reihenfolge des Contigs NT\_004487 verglichen. Dieser Vergleich lieferte für die damals schon bekannten Gene identische Ergebnisse.

Zusätzlich sind besonders in der *SPR*-Gengruppe, aber auch in der Gruppe der *S100*-Gene zwischen 1996 und 2004 neue Untergruppen im Rahmen des Humanen Genomprojektes identifiziert worden. Diese waren in dem NCBI-Contig aufgereiht und konnten somit in die Aufzählungsreihenfolge übernommen werden.

Centromer

- D1S498
- *S100A11*
- *FLG*
- *SPRL5A*
- *SPRL6A*
- *SPRL3 A*
- *SPRL1A*
- *SPRL1B*
- *SPRL4A*
- *SPRL2A*
- *IVL*
- *SPRR4*
- *SPRR1A*
- *SPRR3*
- *SPRR1B*
- *SPRR2B*

- *SPRR2A*
- *LOR*
- *S100A9*
- *S100A12*
- *S100A8*
- *S100A15*
- *S100A7*
- *S100A6*
- *S100A5*
- *S100A4*
- *S100A3*
- *S100A2*
- *S100A16*
- *S100A14*
- *S100A13*
- *S100A1*
- D1S305

Telomer

Als Kandidatengene wurden zuerst *FLG*, *IVL* und *LOR* näher betrachtet. Diese drei Gene liefern wichtige Proteine für den Aufbau des CE und stellen somit funktionell für Verhornungsstörungen interessante Gene dar. Eine weitere NCBI-Datenbankrecherche ergab, dass bisher nur in *LOR* Mutationen bekannt waren. Insofern stellte *LOR* sowohl in positioneller als auch in funktioneller Hinsicht ein gutes Kandidatengen mit bereits bekannten Mutationen dar. Folglich wurde *LOR* als erstes Kandidatengen sequenziert.

## 3.2 Sequenzierung und Mutationsnachweis

### 3.2.1 Sequenzreaktion

Im Folgenden wurde zuerst eine PCR zur Amplifikation der *LOR*-Sequenz etabliert und das Produkt anschließend sequenziert. Zur Amplifikation wurde ein Primerpaar

entworfen, welches die gesamte kodierende Sequenz von *LOR* flankiert. Allerdings gestaltete sich die anschließende Etablierung der PCR-Bedingungen schwierig, da *LOR* durch den CG-Reichtum nur sehr schwer zu amplifizieren war. Deshalb erfolgte probeweise der Einsatz der im Folgenden beschriebenen Methoden und Materialien. Ein Touchdown-Programm, wie es bei der Feinkartierung angewandt worden war, führte zu keiner Amplifikation. Eine Temperaturgradienten-PCR legte eine Annealing-Temperatur von 58°C nahe. Das „Triple-Master™-PCR-System“ mit besonderer Zusammensetzung des Reaktionspuffers für CG-reiche Sequenzen zeigte nur unspezifische Banden. Zu einem weiter verwendbaren Ergebnis führten die Verlängerungen des Annealingschritts und des Elongationsschritts sowie die Zugabe von 5% DMSO. Dieses Produkt wurde für die Etablierung der Sequenzierung eingesetzt.

Die Auswahl der Primer für die Sequenzierung bereitete Probleme, da *Loricrin* aus sehr vielen Glycin-Aminosäuren besteht und *LOR* viele repetitive Sequenzen aufweist. Gesucht wurden Bereiche, die in ihrer Zusammensetzung möglichst einzigartige Sequenzen aufweisen, damit die Primer spezifisch an genau dieser Stelle und nicht mehrfach im Gen binden. In der Praxis zeigte sich, dass die Primer *LOR\_B\_F* und *LOR\_D\_F* keine verwendbaren Ergebnisse lieferten. Die Ergebnisse mit den Primern *LOR\_R* und *LOR\_C\_F* ließen sich nicht immer gut reproduzieren. Daher wurden als neue Primer *LOR\_3\_F* und *LOR\_7\_R* eingesetzt (Abb. 5). Mit diesen und dem Primer *LOR\_A\_F* wurde die Sequenzreaktion schließlich etabliert. Auch hier ließ sich das Standardprotokoll wegen des CG-Reichtums nicht anwenden. Weder eine Erhöhung der Annealing- oder Denaturierungstemperatur, noch die Verdopplung der Big-Dye-Konzentration führten zu einem befriedigenden Ergebnis. Auch die Verlängerung der Anzahl der Zyklen erwies sich als nicht sinnvoll. Aussagekräftige Sequenzen erbrachte schließlich nur eine vorgeschaltete Denaturierung von 5 min bei 98°C vor Ablauf der Sequenzreaktion.

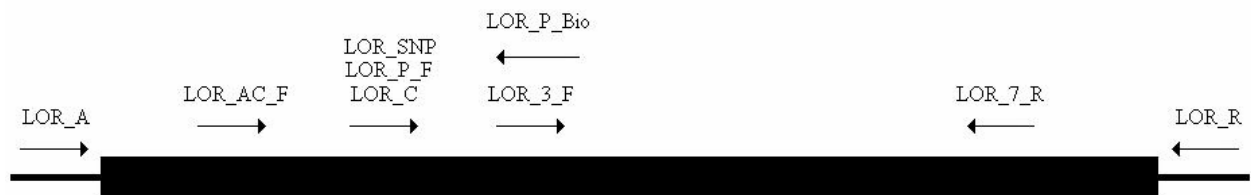


Abb. 5: Verwendete Primer

### 3.2.2 Auswertung

In der anschließenden Sequenzierung der DNA aller 13 Mitglieder der Familie MDC-804 fand sich bei allen betroffenen Patienten eine heterozygote Insertion von einer Base Guanin an Position 730 in *LOR* (Abb. 6 und Abb. 7).

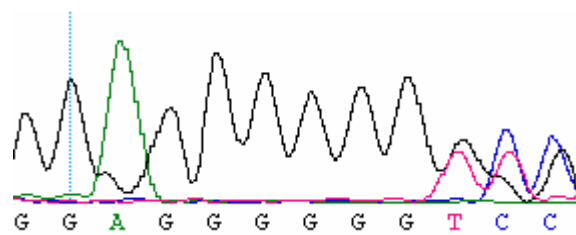


Abb. 6: Mutation 730insG

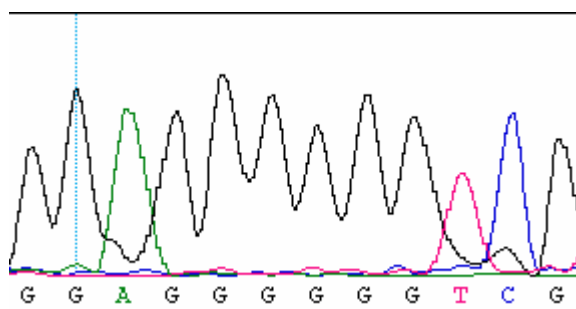


Abb. 7: Wildtyp

Diese Mutation wurde mehrfach bei der Diagnose Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa beschrieben (Abschnitt 1.4.1)<sup>41,50,60,76</sup>.

### 3.3 Mutationsausschluss bei der autosomal dominanten lamellären Ichthyose (ADLI) in Bezug auf *LOR*

Um festzustellen, ob es sich bei dem Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa und der ADLI um allelische Krankheiten handelt, wurden weitere vier Familien mit Verdachtsdiagnose ADLI auf Mutationen in *LOR* untersucht. In allen Familien wurden keine Mutationen in der kodierenden Sequenz von *LOR* gefunden.

Nur bei der Familie B-4601 (Abb. 11) konnte sicher von einem autosomal dominanten Vererbungsmodus mit vollständiger Penetranz ausgegangen werden. In den Familien B-4555 (Abb. 8), B-4571 (Abb. 9) und B-4565 (Abb. 10) war eine autosomal dominante Vererbung unter Annahme unvollständiger Penetranz, allerdings als möglich anzusehen.

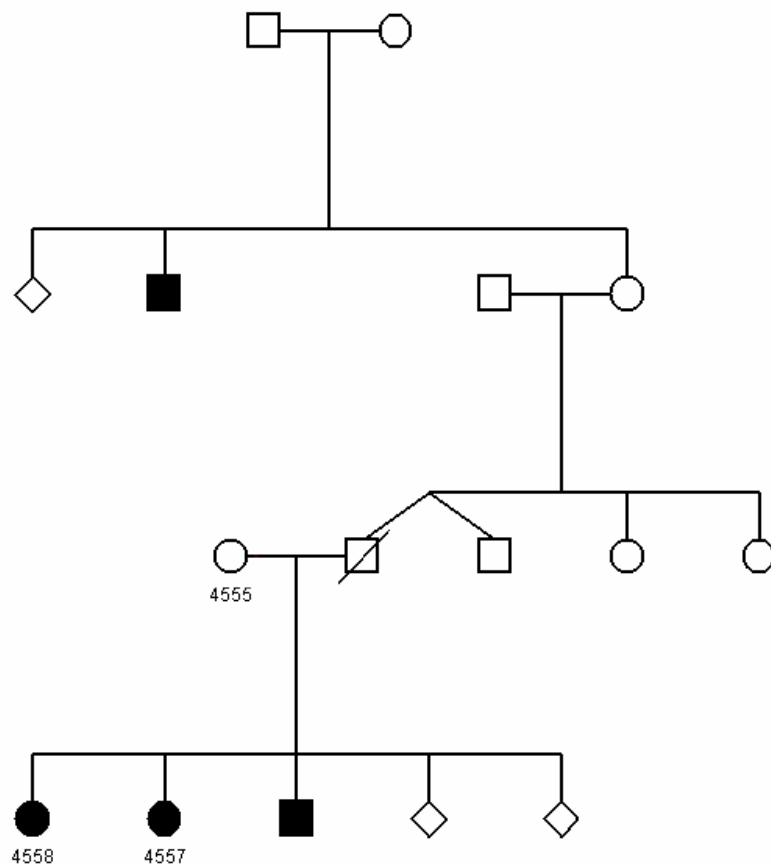


Abb. 8: Stammbaum Familie B-4555

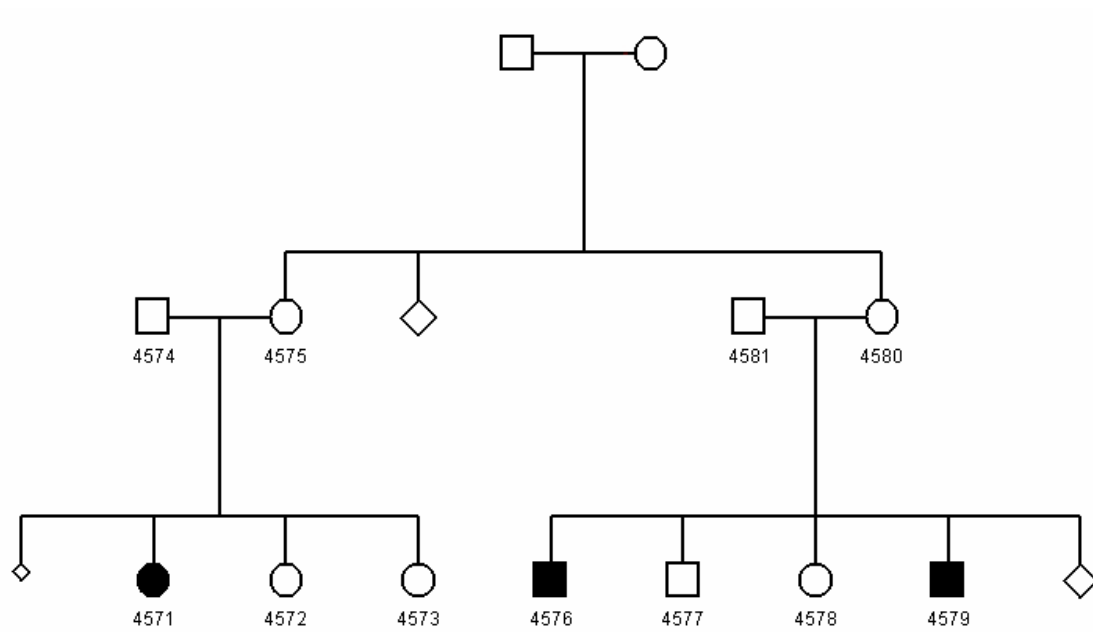


Abb. 9: Stammbaum Familie B-4571

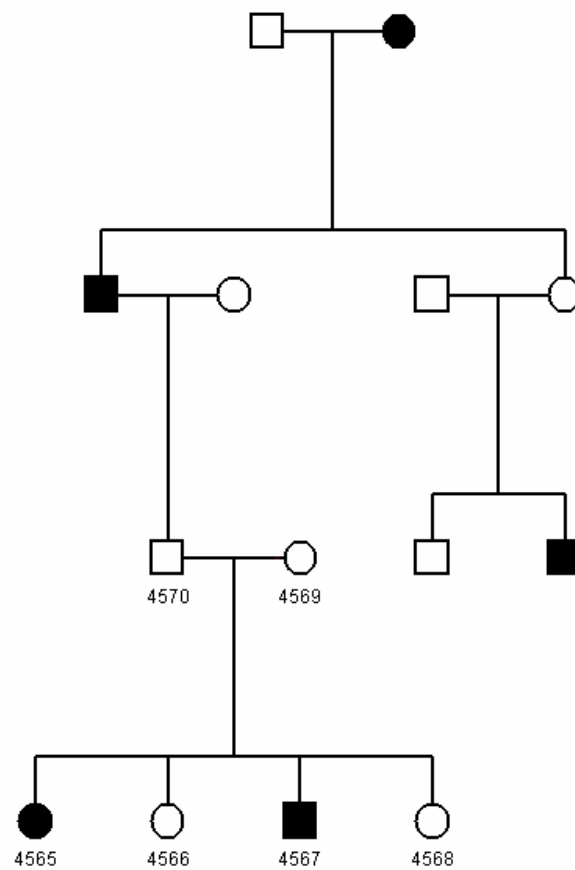


Abb. 10: Stammbaum Familie B-4565



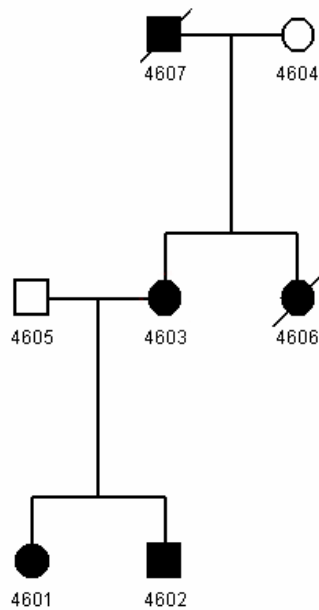


Abb. 11: Stammbaum Familie B-4601

### 3.4 Klinische Diagnostik

Es wurden drei Familienmitglieder der Familie MDC-804 von der Autorin selbst dermatologisch mituntersucht.

Die Befunde sind im Folgenden dargestellt:

#### Patientin 16

Die Patientin gab an, als Kollodiumbaby geboren worden zu sein. Die Ichthyose war lamellär, mild ausgebildet und besonders großflächig am Rücken sichtbar. Des Weiteren zeigte sich eine leichte Verdickung der Haut über den Fingerknöcheln (prominente Fingerknöchel). Die palmoplantare Hyperkeratose (PPK) erschien honigwabenförmig und beschränkte sich hauptsächlich auf Handinnenflächen und Fußsohlen. Die PPK war stärker palmar als plantar ausgeprägt. Hand- und Fußrücken zeigten sich unauffällig ohne seesternförmige Hyperkeratosen. Weder an den Fingern noch an den Zehen waren Einschnürungen oder Autoamputationen sichtbar. Mit zunehmendem Alter entwickelte sich bei der Patientin eine Vitiligo. Die Haare, die Zähne und die Nägel waren unauffällig. Es gab keinen Anhalt für Schwerhörigkeit.

#### Patientin 18

Auch Patientin 18, die Nichte von Patientin 18, berichtete, als Kollodiumbaby geboren worden zu sein. Die Ausprägung der lamellären Ichthyose erschien stärker als bei Patientin 16. Deutliche, hyperpigmentierte Lichenifikationen (Abb. 13) waren besonders am Hals, den Handgelenken, in der Leistengegend, den Ellenbeugen, den Kniekehlen und den Achselhöhlen sichtbar. Die Haut über den Fingerknöcheln wies Verdickungen auf (prominente Fingerknöchel). Ein honigwabenförmiges Aussehen kennzeichnete die Hyperkeratose, welche sowohl palmar als auch plantar deutlich sichtbar war und sich nicht auf Hand- oder Fußrücken ausbreitete (Abb. 12). Auf Hand- und Fußrücken fanden sich keine seesternförmigen Hyperkeratosen. Genauso wie bei Patientin 16 fehlten Einschnürungen oder Autoamputationen an Fingern oder Zehen. Zusätzlich hatte die Patientin eine starke Neurodermitis mit besonders an den Extremitäten sichtbaren Excoriationen. Die Haare, die Zähne und die Nägel waren unauffällig. Es gab keinen Anhalt für Schwerhörigkeit.

#### Patientin 20

Bei der ebenfalls als Kollodiumbaby geborenen Patientin 20, Tochter von Patientin 18, zeigte sich eine milde Ausprägung der Ichthyose. Die Lichenifikationen erschienen im Bereich der Handgelenke und Kniekehlen hyperpigmentiert. Außerdem waren Lichenifikationen in der Achselhöhle, den Ellenbeugen und periumbilical sichtbar. Die Haut über den Fingerknöcheln wies eine deutliche Verdickung auf (prominente Fingerknöchel) (Abb. 14). Auch schien die Palmoplantarkeratose palmar stärker ausgeprägt als plantar. Wie bei Patientin 18 zeigte die PPK sich honigwabenförmig und auf Handinnenflächen und Fußsohlen begrenzt. Einschnürungen oder Amputationen waren nicht auffindbar. Die Patientin hatte, wie auch ihre Mutter (Patientin 18) Neurodermitis. Leichte Excoriationen befanden sich im Unterarmbereich. Die Haare, die Zähne und die Nägel waren unauffällig. Es gab keinen Anhalt für Schwerhörigkeit.



Abb. 12: Patientin 18, honigwabenhörmige Palmoplantarkeratose ohne Konstriktoren der Finger mit Lichenifikationen über dem Handgelenk



Abb. 13: Patientin 18, Lichenifikationen in der Ellenbeuge



Abb. 14: Patientin 20, prominente Fingerknöchelverdickungen

### 3.5 Merkmale im Literaturvergleich

Im Folgenden werden Publikationen verglichen, welche Mutationen im Loricrin-Gen beschreiben. Dadurch sollte der eigene Mutationsbefund besser eingeordnet und eine mögliche Genotyp/Phänotyp-Beziehung untersucht werden.

Verglichene Publikationen:

Armstrong<sup>4</sup>

Ishida-Yamamoto<sup>30</sup>

Korge<sup>41</sup>

Maestrini<sup>50</sup>

Matsumoto<sup>53</sup>

O'Driscoll<sup>60</sup>

Takahashi<sup>76</sup>

Von der Autorin wurden anhand der in den Publikationen aufgeführten Merkmale entsprechend der Häufigkeit des Auftretens neun Merkmale festgelegt:

- Wabenförmige, diffuse Palmoplantarkeratose (PPK)
- Ichthyose
- Pseudoainhums
- Autoamputationen
- Geburt als Kollodiumbaby
- Prominente Fingerknöchel
- Seesternförmige Hyperkeratosen auf Hand- oder Fußrückseite
- Hyperkeratose an Ellenbogen und Knie
- Schwerhörigkeit

Für alle sieben publizierten Familien lagen auswertbare Ergebnisse vor. Ein Merkmal wurde als vorhanden gewertet, wenn es bei mindestens einem Familienmitglied beschrieben wurde. Durch die Auswertung ergaben sich für diese sieben Familien unter der Betrachtung von neun untersuchten Merkmalen 63 Einzelereignisse. Hierbei wurden 30-mal Merkmale beschrieben (47,6%), 13-mal wurde das Vorhandensein von einzelnen Merkmalen verneint (20,6%) und in 20 Fällen wurden keine oder ungenaue Angaben gemacht (31,8%).

In einer tabellarischen Auswertung wurden prozentuale Angaben erstellt (Tabelle 2).

Als gesamt wurde die Häufigkeit definiert, mit welcher das jeweilige Merkmal bei allen sieben Familien vorkam.

Als anteilig wurde die Häufigkeit definiert, mit welcher das jeweilige Merkmal in den Familien vorkam, für die eine Angabe erhältlich war.

Tabelle 2: Merkmalauswertung für publizierte Familien

	vorhanden	Nicht vorhanden	keine Angabe	gesamt	anteilig
Wabenförmige, diffuse PPK	7	0	0	100%	100%
Ichthyose	7	0	0	100%	100%
Pseudoainhums	7	0	0	100%	100%
Autoamputationen	2	5	0	28,6%	28,6%
Kollodiumbaby	2	0	5	28,6%	100%
Prominente Fingerknöchel	1	0	6	14,3%	100%
Seesternförmige Hyperkeratosen	1	2	4	14,3%	33,3%
Hyperkeratosen Knie, Ellenbogen	2	0	5	28,6%	100%
Schwerhörigkeit	1	6	0	14,3%	14,3%
Σ	30 47,6%	13 20,6%	20 31,8%		

Aus den Publikationen wurden noch folgende assoziierte Merkmale bei jeweils einer Familie entnommen:

- Generalisierte, diffuse Erythrodermie<sup>53</sup>
- Erythematöse Hyperkeratose der Beugeseiten der Handgelenke<sup>4</sup>
- Gut abgegrenzte rötliche erythematöse Läsionen mit pityriasiformer Schuppung an Rumpf, Gesicht und Extremitäten<sup>30</sup>

Eine Einzelauswertung in Bezug auf die betroffenen Personen der publizierten Familien gestaltete sich als kompliziert. Besonders in der Publikation von Maestrini und Mitarbeitern<sup>50</sup> wurden klinische Merkmale nur zusammenfassend für den gesamten Stammbaum beschrieben, woraus sich nicht auf die Merkmale von Einzelpersonen schließen ließ. Daher wurde diese Publikation in die Einzelauswertung nicht mit einbezogen. Die Angaben der Publikation von Korge und Mitarbeitern<sup>41</sup> ließen sich durch persönliche Nachfrage<sup>55</sup> weitgehend vervollständigen und damit integrieren.

Zur Auswertung eigneten sich Merkmale von 19 Personen (13 Frauen und 6 Männer) aus sechs Familien, die anhand der neun untersuchten Merkmale 171 Einzelereignisse lieferten. Hierbei wurden 76-mal Merkmale beschrieben (44,5%), 45-mal wurde das Vorhandensein von einzelnen Merkmalen verneint (26,3%) und in 50 Fällen wurden keine oder ungenaue Angaben gemacht (29,2%).

In einer tabellarischen Auswertung wurden prozentuale Angaben erstellt (Tabelle 3). Gesamt und anteilig entsprachen der oben angeführten Definition.

Tabelle 3: Merkmalauswertung Individuen der publizierten Familien

	vorhanden	nicht vorhanden	keine Angabe	gesamt	anteilig
Wabenförmige, diffuse PPK	19	0	0	100%	100%
Ichthyose	19	0	0	100%	100%
Pseudoainhums	17	2	0	89,5%	89,5%
Autoamputationen	2	17	0	10,5%	10,5%
Kollodiumbaby	4	0	15	21,1%	100%
Prominente Fingerknöchel	7	0	12	36,8%	100%
Seesternförmige Hyperkeratosen	0	8	11	0%	0%
Hyperkeratosen Knie, Ellenbogen	7	0	12	36,8%	100%
Schwerhörigkeit	1	18	0	5,3%	5,3%
$\Sigma$	76 44,5%	45 26,3%	50 29,2%		

### **3.6 Diagnostik für Patienten mit der Verdachtsdiagnose Loricrin-Keratoderma**

Aus der etablierten Sequenzierung konnte im weiteren Verlauf eine Standarddiagnostik zur Fragestellung Loricrin-Keratoderma entwickelt werden. Es wurden vier Proben mit der Verdachtsdiagnose Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa aus verschiedenen Teilen Deutschlands bearbeitet. Ein Problem bestand darin, dass ein Insertionspolymorphismus von Glycin, Glycin, Serin, Glycin in Loricrin in der Bevölkerung vorkommt<sup>28</sup>. Aufgrund dessen war die Sequenz mit dem Primer LOR\_3\_F bei einer heterozygoten Insertion des Öfteren nicht bis zum Ende der kodierenden Sequenz auswertbar. Die am Besten zu verwertenden Ergebnisse wurden durch den Einsatz des Rückwärtsprimers LOR\_R erzielt. Da auch die Qualität der DNA-Proben unterschiedlich zu sein schien, war der Primer LOR\_A\_F nicht immer bis zum Anfang des Primers LOR\_3\_F auswertbar. Weitere Probesequenzierungen ergaben hier sehr gute Resultate mit dem Primer LOR\_AC\_F. Die zusätzlichen Primer LOR\_AC\_F und LOR\_R ermöglichten somit eine Sequenzierung des gesamten codierenden Bereichs von *LOR*. Eine Mutation in diesem Bereich konnte in allen untersuchten Fällen ausgeschlossen und in keinem Diagnostikfall eine positive Diagnose gestellt werden.

### **3.7 RNA-Extraktion**

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand in der Extraktion und Amplifikation von *LOR*-RNA. Die RNA-Extraktion wurde benötigt, um anschließend die daraus gewonnene cDNA mithilfe von Pyrosequenzierung auf Expressionsunterschiede zwischen den Allelen zu untersuchen.

Als Kontrolle der erfolgreichen RNA-Extraktion und DNA-Synthese galt die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-PCR, da die RNA des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P) in fast jeder Zelle vorkommt. Die G6P-Primer wurden so gewählt, dass diese in zwei verschiedenen Exons des G6P-Gens lokalisiert waren und mindestens ein Intron in der zu amplifizierenden Sequenz lag. Dadurch hat das G6P-DNA-PCR-Produkt eine längere Sequenz als das G6P-RNA-PCR-Produkt, da bei der RNA im Splicevorgang die Introns entfernt wurden. Anhand der unterschiedlichen



Länge der PCR-Produkte war daher gut erkennbar, ob ein DNA- oder ein RNA-Produkt vorlag. Bei der kodierenden Sequenz von *LOR* war dies leider nicht möglich, da sich diese Sequenz nicht über ein Intron auf zwei Exons erstreckt und kein Splicen erfolgt. Daher wurde hier als Kontrolle aus denselben RNA-Proben auch eine G6P-PCR durchgeführt, um eine mögliche DNA-Kontamination feststellen zu können. Außerdem wurde in der Kontrollprobe ohne Reverse Transkriptase nach einem Produkt gesucht. Da hier keine RNA in cDNA umgewandelt wird, sprach das Vorhandensein eines Produktes in dieser Probe für eine DNA-Kontamination. Zu Beginn wurde ungewollt auch DNA extrahiert und somit auch amplifiziert (Abb. 15). Aus diesem Grunde fand im Vorfeld der RT-PCR eine Inkubation der RNA-Proben mit DNase zum Verdau der DNA statt.

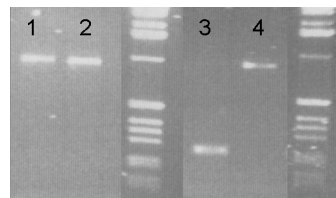


Abb. 15: DNA Kontamination bei RNA aus Blut  
 (1) Loricrin-RNA mit Reverser Transkriptase; (2) Loricrin-DNA-Kontamination ohne Reverse Transkriptase; (3) G6P-RNA mit Reverser Transkriptase (4) G6P- DNA-Kontamination ohne Reverse Transkriptase

### 3.7.1 RNA-Extraktion aus Blut

Als erster Teilschritt fand die Extraktion von RNA aus Blut statt. In der folgenden G6P-PCR war bei der cDNA-Probe eine deutliche Bande sichtbar. Mit dem Primerpaar LOR\_C\_F und LOR\_R wurde versucht, *LOR*-cDNA zu amplifizieren. Eine starke DNA-Kontrollbande auf dem Agarose-Gel zeigte eine erfolgreiche Amplifikation an. Allerdings war kein cDNA-Produkt sichtbar (Abb. 16).

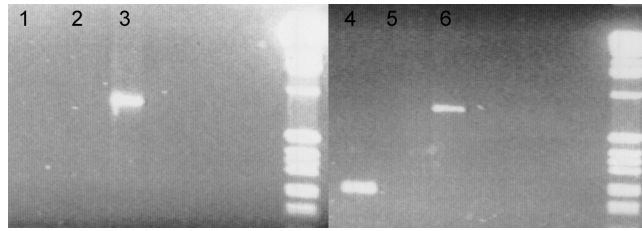


Abb. 16: RNA-Extraktion aus Blut  
 (1-3) Loricrin-RNA mit LOR\_C\_F und LOR\_R; (1) RNA mit Reverse Transkriptase (2) RNA ohne Reverse Transkriptase (3) Kontroll-DNA (4-6) G6P; (4) RNA mit Reverse Transkriptase (5) RNA ohne Reverse Transkriptase (6) Kontroll-DNA

### 3.7.2 RNA-Extraktion aus Haarwurzeln

Im zweiten Ansatz wurde RNA aus Haarwurzeln gewonnen, da diese Hautanhangsgebilde sind und manchmal auch hautspezifische Gene exprimieren. Bei der folgenden PCR ließ sich ebenfalls eine zufrieden stellende Menge an G6P-cDNA amplifizieren. Das Primerpaar LOR\_C\_F und LOR\_R hingegen ergab nur ein schwaches Produkt (Abb. 17). Daraufhin wurde versucht, mit dem PCR-Produkt eine weitere PCR unter den gleichen Bedingungen mit demselben Primerpaar durchzuführen, um ein stärkeres Produkt zu erhalten. Dies führte zu keiner zunehmenden Amplifikationsmenge. Das zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzte Primerpaar LOR\_AC\_F und LOR\_P\_Bio führte zu keiner Amplifikation (Abb. 18).

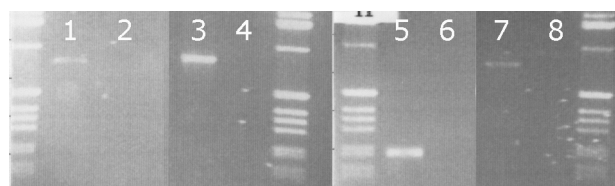


Abb. 17: RNA-Extraktion aus Haarwurzeln  
 (1-4) Loricrin-RNA mit LOR\_C\_F und LOR\_R; (1) RNA mit Reverse Transkriptase (2) RNA ohne Reverse Transkriptase (3) Kontroll-DNA (4) Leerwert (5-8) G6P; (5) RNA mit Reverse Transkriptase (6) RNA ohne Reverse Transkriptase (7) Kontroll-DNA (8) Leerwert

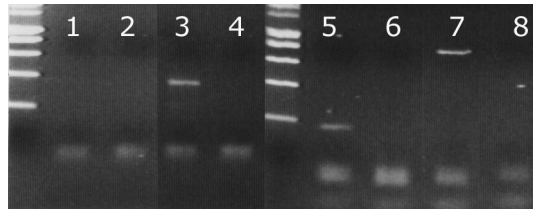


Abb. 18: RNA-Extraktion aus Haarwurzeln  
 (1-4) Loricrin-RNA mit LOR\_AC\_F und LOR\_P\_Bio; (1) RNA mit Reverser Transkriptase (2) RNA ohne Reverse Transkriptase (3) Kontroll-DNA (4) Leerwert (5-8) G6P; (5) RNA mit Reverser Transkriptase (6) RNA ohne Reverse Transkriptase (7) Kontroll-DNA (8) Leerwert

### 3.7.3 RNA-Extraktion aus Haut

Erst nachdem sich Loricrin-RNA weder aus Blut noch aus Haaren in zufrieden stellender Menge amplifizieren ließ, wurde RNA aus Haut extrahiert. Die daraus entstandene cDNA ließ sich sowohl mit den G6P-Primern als auch mit LOR\_AC\_F und LOR\_P\_Bio in ausreichendem Maße amplifizieren (Abb. 19). Auf die Verwendung des Primerpaares LOR\_C\_F und LOR\_R konnte verzichtet werden, da die anderen Primer bereits aussagekräftige Ergebnisse lieferten. Außerdem wurde für die folgenden Versuche nur das Produkt des Primerpaares LOR\_AC\_F und LOR\_P\_Bio benötigt. Bei der Verwendung des „RNeasy® Lipid Tissue Mini Kits“ konnte auf den DNase-Verdau-Schritt verzichtet werden, da die Ergebnisse gleichermaßen frei von DNA waren (Abb. 20).

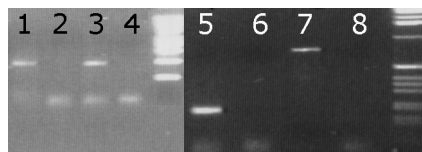


Abb. 19: RNA-Extraktion aus Haut  
 (1-4) Loricrin-RNA mit LOR\_AC\_F und LOR\_P\_Bio; (1) RNA mit Reverser Transkriptase (2) RNA ohne Reverse Transkriptase (3) Kontroll-DNA (4) Leerwert (5-8) G6P; (5) RNA mit Reverser Transkriptase (6) RNA ohne Reverse Transkriptase (7) Kontroll-DNA (8) Leerwert

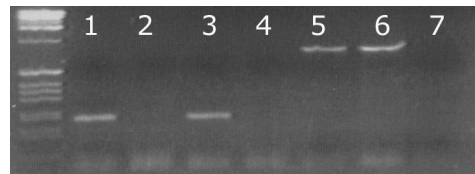


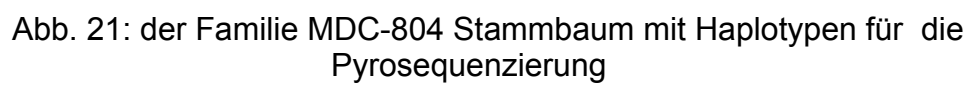
Abb. 20: RNA-Extraktion aus Haut; G6P

(1) RNA mit Reverser Transkriptase und ohne DNase-Verdau (2) RNA ohne Reverse Transkriptase ohne DNase-Verdau (3) RNA mit Reverser Transkriptase und mit DNase-Verdau (4) RNA ohne Reverse Transkriptase mit DNase-Verdau (5-6) Kontroll-DNA (7) Leerwert

## 3.8 Expressionsanalyse auf RNA-Ebene

### 3.8.1 SNP-Suche

Zur Expressionsanalyse auf RNA-Ebene fand die Pyrosequenzierungsmethode Anwendung. Zu Beginn wurden die *LOR*-Sequenzen aller Mitglieder der Familie MDC-804 manuell nach Einzelnukleotid-Polymorphismen („Single Nucleotide Polymorphism“; SNP) durchsucht. Dabei ergaben sich im kodierenden Bereich zwei polymorphe Positionen, an denen betroffene Familienmitglieder heterozygot waren. Beim Abgleich mit der NCBI-Datenbank wurden diese polymorphen Positionen als SNP rs6661601 und rs1143390 identifiziert. Beide SNPs liegen im kodierenden Bereich von *LOR*. Die Allelfrequenzen wurden in der NCBI-Datenbank nicht angegeben. Bei dem SNP rs1143390 kommt es durch den Basenaustausch zu keiner Veränderung der Aminosäure Glycin. Der SNP rs6661601 wiederum führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin. Diese ausgetauschte Aminosäure wird von 12 Glycin-Aminosäuren flankiert. Wie schon in Abschnitt 1.2.3 erwähnt führen einzelne Veränderungen von Aminosäuren in den Glycin-„Loops“ zu keinen funktionellen Veränderungen<sup>28</sup>. Daher ist auch an dieser Stelle von keiner funktionellen Veränderung des Proteins Loricrin auszugehen.



Anschließend erfolgte eine manuelle Haplotypisierung (Abb. 21) der Familie MDC-804. Patientin 20 war in Bezug auf rs6661601 heterozygot mit den Basen Guanin/Adenin. Aus der Haplotypisierung war ersichtlich, dass die Base Guanin mit der Mutation assoziiert war, da sowohl die Mutter (Patientin 18) als auch die Großtante (Patientin 16) für diesen SNP homozygot Guanin aufwiesen. Außerdem zeigte der gesunde Vater (Patient 19) für rs6661601 eine Homozygotie in Bezug auf Adenin. Für rs1143390 waren Patientin 18 und 16 heterozygot Cytosin/Adenin. Hier war die Assoziation von Cytosin mit der Mutation aus der Haplotypisierung erkennbar. Patient 14 konnte aufgrund seiner Homozygotie nur Cytosin an seine Tochter (Patientin 18) vererben. Patientin 16 konnte nur Adenin an ihren gesunden Sohn (Patient 22) vererben, da dieser homozygot für Adenin war. Es hat somit eine Weitervererbung von Adenin mit dem Wildtyp-Allel stattgefunden. Im Weiteren wurde der SNP rs1143390 verwendet, da sich Patientin 16 zu einer Hautspende bereit erklärte.

### **3.8.2 Pyrosequenzierung**

Im folgenden Verlauf fand die Etablierung der PCR für die Pyrosequenzierung statt. Auch diese Replikation gestaltete sich problematisch. Der zuerst verwandte Primer LOR\_P\_F war nur ein Basenpaar länger als der Primer LOR\_C. Jedoch wies LOR\_P\_F laut Vorschlag des Computerprogramms Primer 3 eine passendere Annealing-Temperatur zum Rückwärtsprimer LOR\_P\_Bio auf. Deshalb wurde zur PCR anfänglich das Primerpaar LOR\_P\_F und LOR\_P\_Bio verwendet. Diese Primer amplifizierten ein Produkt von 233 Basenpaaren. Mit der Zugabe von DMSO ließ sich kein sichtbares Produkt amplifizieren. Betain-Monohydrat hingegen wirkte sich förderlich auf die Amplifikation aus.

Es erfolgte eine Verlängerung des Annealing- und des Extensionsschritts des PCR-Programms. Bei den Temperaturen von 57°C bis 65°C in Abständen von jeweils 1°C wurden die folgenden Konzentrationsgradienten untereinander ausgetestet:

- Magnesiumchlorid von 25 nmol bis 100 nmol
- Primer von 3 nmol bis 5 nmol
- dNTP von 0,5 nmol bis 1,25 nmol je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- DNA-Polymerase von 0,5 U bis 1 U

Selbst unter den dabei als optimal ermittelten Bedingungen bei einer Annealing-Temperatur von 58°C, 25 nmol MgCl<sub>2</sub>, 1,25 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 5 nmol von jedem Primer ergaben sich unsaubere und nicht genau auswertbare Pyrosequenzierungsergebnisse. Eine einfache Aufreinigung des PCR-Produktes mit „Millipore Amicon®Microcon®-PCR Centrifugal Filter Devices“ zeigte keine besseren Ergebnisse. Bei der Aufreinigung aus Agarose-Gelen waren die Ergebnisse zwar sauber, aber so schwach, dass nur mit vierfachem Ansatz verwertbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Hier konnte auch nicht das später verwandte Aufreinigungskit von Millipore benutzt werden, da sich das Endvolumen als zu groß und zu wenig konzentriert für die Weiterverarbeitung erwies. Bei der Aufreinigung mit Glasmilch („Gene Clean III Kit“) ergab sich ein zu hoher Produktverlust. Nur mit dem „Spin DNA Extraction Kit“ von Invisorb konnte aufgrund der Aufreinigung über eine Säule das Endvolumen verringert und die Endkonzentration erhöht werden. Dadurch war ein großer Einsatz von DNA und cDNA nötig. Aus diesem Grunde wurden neue Primer entworfen. Dieser neue Vorwärtsprimer wies eine zusätzliche Base Thymin auf, welche in der eigentlichen Sequenz nicht vorkam. Das Thymin wurde in der PCR mit amplifiziert und sollte dadurch die Bildung von Sekundärstrukturen des Produktes verringern.

Das neu eingesetzte Primerpaar LOR\_AR\_F und LOR\_AC\_R stellte sich als nicht spezifisch genug heraus, da durchweg zwei Produkte verschiedener Länge amplifiziert wurden. Daraufhin fand eine Amplifikation von LOR\_P\_F mit LOR\_AC\_R und LOR\_AC\_F mit LOR\_P\_Bio statt. Letzteres Primerpaar führte dann zu einem spezifischen Produkt. Dieses Produkt hatte eine Länge von 353 Basenpaaren. Auch hier wurden die oben aufgeführten Temperaturen und Konzentrationsgradienten ausgetestet. Die Enddaten sind dem Teil Methoden (Abschnitt 2.2.1.7) zu entnehmen. Eine Gelaufreinigung mit „Millipore Ultrafree®-DA“ erwies sich als immer noch notwendig, um saubere Leerwerte nicht nur in der PCR-Kontrolldokumentation auf dem Agarose-Gel, sondern auch nach der Pyrosequenzierung zu erhalten. Ähnlich gute Ergebnisse wurden ohne Gelaufreinigung durch die Zugabe von 900 ng SSBP vor der Sequenzierung erzielt. Im Weiteren kam das SSBP zum Einsatz, da dieses zu weniger Produktverlust führte und weniger Aufwand verursachte.

Es schlossen sich Versuche zur Verstärkung der Pyrosequenzierungssignale an, indem die Primerkonzentration verdoppelt oder das Zweifache des Produktes eingesetzt wurde. Dieses Vorgehen führte jedoch zu keinen stärkeren Pyrosequenzierungsprodukten.

### **3.8.3 Auswertung**

Wie aus Abb. 20 ersichtlich, erwies sich der DNase-Verdau bei den Produkten der cDNA von Hautproben als nicht notwendig.

Nach erfolgreicher Etablierung der einzelnen Schritte wurden mehrere Messreihen mit folgenden Proben durchgeführt:

- RNA der Patientin 16, RT-PCR mit Reverser Transkriptase
- RNA der Patientin 16, RT-PCR ohne Reverse Transkriptase
- DNA der Patientin 16
- DNA der Patientin 18
- Kontroll-DNA ohne Sequenzierprimer
- Leerwert ohne DNA mit Sequenzierprimer

Zur Auswertung wurden nur die fünf Messreihen herangezogen, die eindeutig keine DNA-Spuren in der RNA-Leerprobe nach der Sequenzierung aufwiesen (Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24). Mit Hilfe der PSQ HS 96 A Software Version 1.1 konnten automatisch die prozentualen Anteile der beiden Basen Adenin und Cytosin errechnet werden. Für jede der beiden Basen wurde der Mittelwert der RNA-Messungen von Patientin 16 und der DNA-Messungen der Patientinnen 16 und 18 berechnet. Die DNA-Aufteilung der Allele zeigte im Mittelwert 44,5% für Adenin und 55,5% für Cytosin. Diese Werte waren bei beiden DNA-Proben der Patientinnen 16 und 18 kongruent. Das mit der Mutation assoziierte Cytosin-Allel zeigte bei der RNA der Patientin 16 im Mittelwert eine prozentuale Senkung von 2,8 auf 52,7% auf. Es lag auch jeder RNA-Einzelwert unter dem dazugehörigen DNA-Wert. Der Mittelwert von dem gesunden Allel mit Adenin wies kompensatorisch eine Erhöhung um 2,8 auf 47,3% auf (Abb. 25).



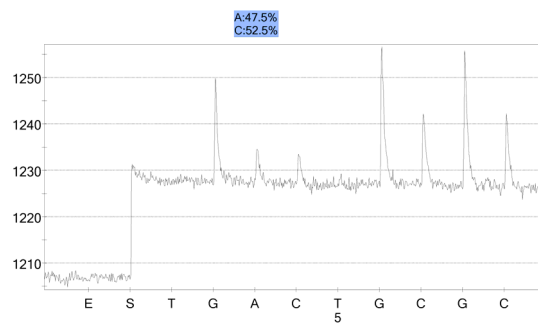


Abb. 22: Pyrogramm; RNA aus Haut der Patientin 16 mit Reverser Transkriptase

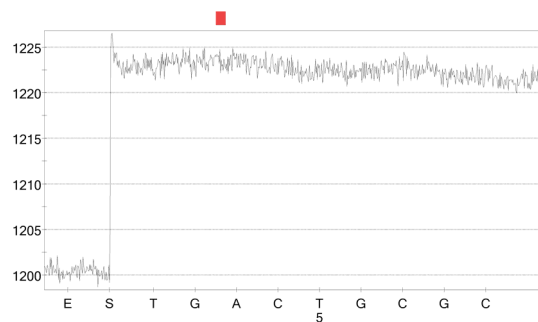


Abb. 23: Pyrogramm; Leerkontrolle RNA aus Haut der Patientin 16 ohne Reverse Transkriptase

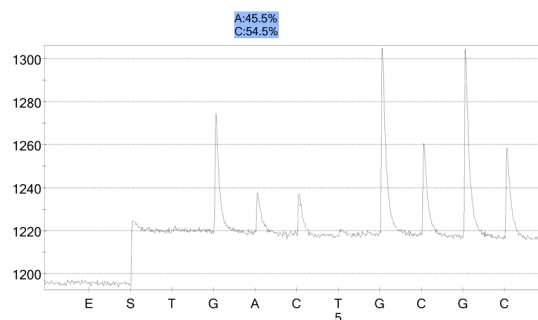


Abb. 24: Pyrogramm; DNA der Patientin 16

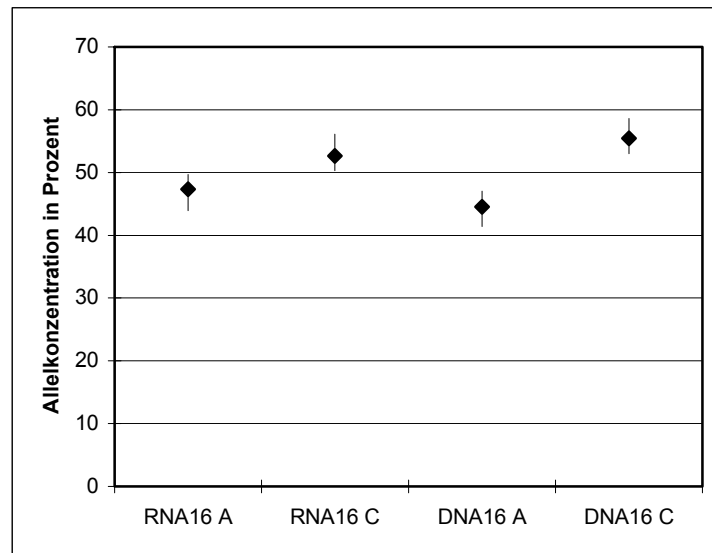


Abb. 25: Prozentuale Verteilung der Allelkonzentrationen A bzw. C in RNA und DNA gebildeter Mittelwert sowie minimaler und maximaler gemessener Anteil bei fünffacher Bestimmung von Patientin 16 (n=1)

# 4 Diskussion

## 4.1 Genetische und klinische Diagnose

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Feinkartierung der Familie MDC-804 mit der Verdachtsdiagnose ADLI und anschließender Kandidatengensuche. Ein etwas unerwarteter Mutationsfund im Loricrin-Gen führte zu einer Reevaluation der klinischen Befunde der Familie MDC-804 und zur Diagnose Loricrin-Keratoderma.

### 4.1.1 Kandidatengensuche

Bei der Familie MDC-804 wurde ursprünglich die Verdachtsdiagnose ADLI gestellt. In der genomweiten Kartierung ergab sich bei der Familie ein maximaler Lod-Wert von 2,8 für den Marker bei D1S498. Erst ein Lod-Wert über 3,0 gilt als signifikant. Jedoch wurde hier der maximale Wert für die Familiengröße von 13 Mitgliedern erreicht, da der zu erwartende Lod-Wert („elod“) nur bei 2,6 lag. Die Haplotypisierung der Familie mit anschließender Feinkartierung im kritischen Bereich engte die Kandidatengenregion auf 23,38 cM ein. Die Größe der Familie erwies sich als ausreichend, um eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Haplotypen vorzunehmen.

Interessanterweise befand sich in der Kandidatengenregion der epidermale Differenzierungskomplex (EDC). Für diesen Bereich wurden genetische und physikalische Karten schon miteinander verglichen<sup>51</sup>. Diese Ergebnisse stimmten auch mit den Daten der NCBI-Datenbank und somit mit den Ergebnissen des Humangenomprojektes überein. Somit konnte auf eigenständige Vergleiche verzichtet werden. Im Rahmen des Humangenomprojektes waren zwischen 1996 und 2004 neue Gene der *SPR*- und *S100A*-Gruppe gefunden worden, die noch nicht bei Marenholz und Mitarbeitern<sup>51</sup> verzeichnet waren. Die Reihenfolge der *SPR*- und *S100A*-Untergruppen wurde vorerst nicht überprüft, da als Kandidatengene vor allem *FLG*, *IVL* und *LOR* in Betracht kamen, deren Proteine eine große Rolle bei dem Aufbau des CE spielen. Da in *LOR* schon Mutationen beschrieben wurden, bot es sich als erstes Kandidatengen an.

#### 4.1.2 Mutationsfund

Der Fund einer schon beim Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa beschriebenen Mutation, 730insG, führte zu der Frage, ob es sich beim Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa und der ADLI um alleleische Krankheiten handelte. Diese Frage konnte weitestgehend verneint werden, da in der original von Traupe und Mitarbeitern beschriebenen Familie B-4601<sup>84</sup> sowie drei anderen Familien (B-4555, B-4565 und B-4571) keine Mutationen im kodierenden Bereich von Loricrin nachgewiesen werden konnten. Allerdings kann nur bei der Familie B-4601 eindeutig von einer autosomal dominanten Vererbung ausgegangen werden. In der Familie B-4571 wurde im Nachhinein eine Mutation im Lipoxxygenase-Gen *ALOX12B* nachgewiesen<sup>14</sup>. Bei den Familien B-4555 und B-4565 ist eine autosomal dominante Segregation nur unter der Annahme verminderter Penetranz möglich, wie es in der Literatur beschrieben wurde<sup>81</sup>.

Aufgrund dieser Sachlage entschied sich die Autorin zu einem Vergleich der Merkmale der publizierten Familien mit Mutationen im Loricrin-Gen.

#### 4.1.3 Merkmaldiskussion für Mutationen im Loricrin-Gen

Bei der Literaturanalyse wurden im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 3.5) neun mögliche Merkmale definiert. Die Betrachtung dieser Merkmale erfolgte einerseits für Familien und andererseits für einzelne Individuen aus diesen Familien. Der erhöhte Anteil von Frauen ist auf die geringe Zahl der detailliert beschriebenen Individuen und somit nur bedingt repräsentativen Fallgruppe zurückzuführen. Bei Betrachtung großer Stammbäume mit Betroffenen ergibt sich in aufeinanderfolgenden Generationen eine gleiche Verteilung von Männern und Frauen. Außerdem wurden Vater-Sohn-Vererbungen beobachtet<sup>50</sup>. Daher kann von einem autosomal dominanten Vererbungsmodus ausgegangen werden.

Der Literaturvergleich ergab, dass alle Patienten eine **honigwabenförmige Palmoplantarkeratose** und **generalisierte Ichthyose** hatten. Beide Merkmale variierten im Schweregrad, so dass ein Patient aufgrund sehr guter Handpflege fast gar keine PPK aufwies<sup>55</sup>.

Die **Pseudoainhums** gelten beim Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa als Leitmerkmal. Bei Betrachtung der Familienauswertung traten in allen Familien (100%) Pseudoainhums auf. Nur bei der Auswertung der einzelnen Patienten verringerte sich der Gesamtteil auf 89,5%. Dabei ist wichtig zu bemerken, dass in der von Camisa beschriebenen Familie auch eine der drei Patientinnen keine Pseudoainhums aufwies<sup>11</sup>. Die aus den Pseudoainhums resultierenden **Autoamputationen** traten nur in drei Familien, davon in zwei Familien gehäuft, und daher nur bei 10,5% der Individuen auf. Daher können weder Autoamputationen noch Pseudoainhums als Leitmerkmal aufgefasst werden.

Unter Einbeziehung aller Patienten wurden nur 28,6% als **Kollodiumbaby** geboren. Im Vergleich dazu waren es aber 100% bei der relativen Auswertung, welches an der häufig nicht getätigten Angabe des Merkmals lag. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass Ereignisse, die im Zusammenhang mit der Geburt der Patienten stehen, häufig nicht erfasst sind.

Das Merkmal Kollodiumbaby sollte daher als fakultativ berücksichtigt werden. Dies könnte dazu führen, dass in Zukunft häufiger Angaben zur Geburt als Kollodiumbaby gemacht werden, und damit die Häufigkeit dieses Merkmals reevaluiert würde.

Das Merkmal **prominente Fingerknöchel** wurde nur bei einer Familie beobachtet und floss in die Einzelauswertung mit sieben Individuen ein. Dies erklärt den erhöhten Wert in der Individuenauswertung, da die meisten anderen Familien nur mit ein bis drei Patienten in die Einzelauswertung eingingen. Allerdings ist der Einwand zu berücksichtigen, dass dieses Merkmal leicht übersehen werden kann. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Familien, die unter keine Angabe gewertet wurden, keine prominenten Fingerknöchel aufwiesen. Auch auf dieses Merkmal sollte deshalb in Zukunft genauer geachtet werden.

**Seesternförmige Hyperkeratosen** sind für das echte Vohwinkel-Syndrom typisch und nur in der Publikation von Maestrini und Mitarbeitern<sup>50</sup> beschrieben. Diese Arbeit wurde wegen der Familiengröße nicht in die Individuenauswertung aufgenommen, weil die Merkmale einerseits nur allgemein beschrieben wurden und andererseits die Familiengröße die Statistik verfälschen würde. Da die seesternförmigen Hyperkeratosen

ein auffälliges Merkmal sind, kann davon ausgegangen werden, dass das Merkmal tatsächlich nicht vorhanden war, wenn keine Angabe getätigt wurde. Daher zählen seesternförmige Hyperkeratosen nicht zu den typischen Merkmalen des Vohwinkel-Syndroms Typ Camisa.

**Hyperkeratosen der Knie oder Ellenbögen** waren in 28,6% der Familien erkennbar. Bei der von Korge und Mitarbeitern<sup>41</sup> beschriebenen Familie konnte auch durch persönliche Nachfrage nicht in Erfahrung gebracht werden, wie viele Patienten dieses Merkmal aufwiesen. Deshalb mussten bei der Individuenauswertung alle Personen dieser Familie unter der Rubrik keine Angabe aufgeführt werden. Die andere Familie, die Hyperkeratosen an Knien oder Ellenbögen aufwies, ist in der Individuenauswertung wiederum mit sieben Individuen vertreten. Die restlichen Familien fließen nur mit ein bis drei Individuen in die Auswertung ein. Der Wert der Rubrik vorhanden ist einerseits durch ungenaue Angaben bei Korge und Mitarbeitern<sup>41</sup> fälschlich erniedrigt, andererseits durch die hohe Individuenzahl bei der anderen Familie erhöht. Trotzdem kann im Mittel der Wert der Rubrik vorhanden als repräsentativ genutzt werden. Hyperkeratosen an Knien oder Ellenbögen können somit als fakultatives Merkmal angesehen werden.

**Schwerhörigkeit** wurde nur bei einer Person aus einer Familie, die nur ein betroffenes Individuum aufwies, beobachtet. Da Schwerhörigkeit das zweite Hauptmerkmal des echten Vohwinkel-Syndroms und somit den Hauptunterschied zur Camisa-Variante darstellt, ist hier wohl eher davon auszugehen, dass es sich um eine zufällige Assoziation handelt.

#### **4.1.4 Klinische Einordnung der Familie MDC-804**

Die Merkmale der lamellären Ichthyose sind in der Einleitung in Abschnitt 1.3 beschrieben worden. Die möglichen Merkmale des Vohwinkel-Syndroms Typ Camisa wurden im vorherigen Abschnitt erörtert.

Es folgt ein Vergleich der Merkmale der ADLI und des Vohwinkel-Syndroms Typ Camisa mit den Merkmalen der Familie MDC-804.

### **Vergleich der Merkmale der ADLI**

Die untersuchten Patientinnen der Familie MDC-804 wiesen eine sehr leichte lamelläre Ichthyose mit PPK auf. Außerdem wurden sie als Kollodiumbaby geboren. Diese Merkmale stimmen mit denen einer milden ADLI überein. Allerdings sind bei ADLI die Lichenifikationen eher dorsal gelegen<sup>84</sup>, während sie bei den Patientinnen der Familie MDC-804 an den Flexorenseiten lokalisiert waren. Da diese besonders bei Patientinnen 18 und 20 sichtbar waren, ist nicht auszuschließen, dass auch die Neurodermitis, die beide zusätzlich aufwiesen, Ursache für die Lichenifikationen ist. Über starken nicht-neurodermitis-assoziierten Juckreiz klagte nur der von Professor Traupe untersuchte Patient 09. Außerdem ist bei ADLI die PPK, die sich bei den Patientinnen palmar prominenter darstellte, mehr plantar als palmar ausgebildet.

### **Vergleich der Merkmale des Vohwinkel-Syndroms Typ Camisa**

Bei der Zweituntersuchung der Familie MDC-804, bei der gezielt die Merkmale des Vohwinkel-Syndroms berücksichtigt wurden, waren besonders bei der Patientin 18 die honigwabenförmige PPK und bei Patientin 20 die prominenten Fingerknöchel zu erkennen. Demgegenüber fehlten bei allen Familienmitgliedern die Konstriktionen der Finger, die bislang als Leitmerkmal für das Vohwinkel-Syndrom galten. Zusammenfassend wies die Familie folgende vier der im Literaturvergleich (Abschnitt 3.5) definierten Merkmale auf:

- Wabenförmige, diffuse Palmoplantarkeratose (PPK)
- Ichthyose
- Geburt als Kollodiumbaby
- Prominente Fingerknöchel

Die genetische Diagnose Loricrin-Keratoderma ist demnach auch in klinischer Hinsicht nachvollziehbar.

Analog zu der beschriebenen Familie MDC-804 hatte auch die von Matsumoto und Mitarbeitern publizierte Familie<sup>53</sup> mit einer Mutation im Loricrin-Gen die Diagnose lamelläre Ichthyose erhalten. Hier war, anders als bei der Familie MDC-804, eine deutliche Erythrodermie sichtbar. Eine weitere Familie mit Erythrodermie und Mutation im Loricrin-Gen wurde als progressive symmetrische Erythrokeratodermie beschrieben<sup>30</sup>. Allerdings fand bei beiden erwähnten Familien nach Mutationsfund keine erneute Evaluation der Merkmale statt. Genauso wie Matsumoto und Mitarbeiter<sup>53</sup> und

Ishida-Yamamoto und Mitarbeiter<sup>30</sup> beschrieben Armstrong und Mitarbeiter eine Familie mit Erythrodermie, hier in Form erythematöser Hyperkeratosen der Beugeseiten der Handgelenke<sup>4</sup>. Dies führte allerdings zu keiner andersartigen Diagnose. Diese Beispiele wie auch der diagnostische Werdegang dieser Arbeit weisen auf die besonderen Schwierigkeiten der Diagnosestellung von Loricrin-Keratoderma hin und zeigen, wie wichtig klare Merkmaldefinition und genetische Diagnose sind. Die Merkmale werden im folgenden Abschnitt zusammenfassend definiert. Auf die Schwierigkeiten der Diagnosestellung wird gesondert in Abschnitt 4.2 eingegangen.

#### **4.1.5 Definition der klinischen Merkmale von Loricrin-Keratoderma**

Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Abschnitte 4.1.3 und 4.1.4 lassen sich eine honigwabenförmige PPK und eine leichte Ichthyose als Hauptmerkmale für Loricrin-Keratoderma definieren. Diese waren bei allen erkrankten Personen der in der Literatur beschriebenen Familien wie auch bei der Familie MDC-804 vorhanden. Die Wichtigkeit des Merkmals Ichthyose zeigt weiterhin eine andere Familie mit honigwabenförmiger PPK aber ohne Ichthyose, die keine Mutation in *LOR* aufwies<sup>1</sup>. Dagegen sollten die Pseudoainhums nicht mehr als Leitmerkmal, sondern als häufig auftretendes Nebenmerkmal bezeichnet werden, da bei der hier beschriebenen Familie MDC-804 kein einziges Mitglied Pseudoainhums aufwies. Außerdem sind Pseudoainhums auch bei folgenden PPKs beschrieben worden:

- Mutilierende Palmoplantarkeratose mit periorifikalen keratotischen Plaques<sup>62</sup>
- Transgrediente und progrediente Palmoplantarkeratose (Mal de Meleda)<sup>6,9</sup>
- Palmoplantarkeratose mit Peridontopathie<sup>52</sup>
- Epidermolytische Palmoplantarkeratose<sup>12</sup>

Auch bei der autosomal rezessiven lamellären Ichthyose wurden Pseudoainhums beschrieben<sup>3,13,15</sup>.



Zusammenfassend lassen sich folgende Haupt- und Nebenmerkmale für Loricrin-Keratoderma definieren:

**Hauptmerkmale:**

- I. Honigwabenförmige Palmoplantarkeratose
- II. Leichte Ichthyose

**Nebenmerkmale:**

- I. Pseudoainhums (häufig)
- II. Autoamputationen
- III. Geburt als Kollodiumbaby
- IV. Prominente Fingerknöchel
- V. Hyperkeratosen an Bereichen wie Knien und Ellenbögen

## **4.2 Nomenklatorschwierigkeiten**

Der Name Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa bereitet bei der Abgrenzung zum ursprünglich beschriebenen Vohwinkel-Syndrom, welches behelfsweise echtes („true“) Vohwinkel-Syndrom genannt wird, Schwierigkeiten. Dies kann einer der Gründe dafür sein, dass der genetische Name Loricrin-Keratoderma fast äquivalent für Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa verwendet wird. Unter der Bezeichnung Loricrin-Keratoderma wird die Heterogenität der klinischen Diagnosen von Familien mit Mutationen in *LOR* zusammengefasst. Es handelt sich dabei also um eine genetische Nomenklatur, welche nichts über die klinische Diagnose aussagt. Rückschlüsse, welche Krankheiten von *LOR* verursacht werden, können nur vorsichtig vorgenommen werden. So wurde zumindest für die symmetrische progressive Erythrodermie *LOR* als Gen ausgeschlossen<sup>25,45</sup>. Auch die Schlussfolgerung, dass *LOR* für die autosomal dominante Form der lamellären Ichthyose verantwortlich sein soll<sup>67</sup>, ist aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit eher unwahrscheinlich. Nach Reevaluation der klinischen Merkmale der Familie MDC-804 wurde die Diagnose ADLI revidiert. Die beiden Familien mit fraglicher symmetrischer progressiver Erythrodermie beziehungsweise lamellärer Ichthyose wiesen sowohl eine honigwabenförmige PPK und Ichthyose als

auch Pseudoainhums auf. Dem zu Folge ist es auch durchaus denkbar, diese als Subtypen des Phänotyps von Loricrin-Keratoderma zu klassifizieren. Aus diesem Grund ist es wichtig, zusätzlich zu der genetischen eine passende klinische Nomenklatur zu finden.

Alternativ zum Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa wird von OMIM die Bezeichnung mutilierende Keratodermie mit Ichthyose angegeben. Das in der Bezeichnung enthaltene Wort mutilierend [Latein: „mutilare“ – verstümmeln<sup>23</sup>] bezieht sich wahrscheinlich auf die Autoamputationen, welche nur bei 11 % aller Individuen beschrieben wurden. Daher sollte der Begriff mutilierende Keratoderma für die Bezeichnung des Olmsted-Syndroms vorbehalten bleiben, welches eine solche Verstümmelung einschließt. Alternativ wird diese PPK auch als mutilierende Palmoplantarkeratose mit periorifikalen keratotischen Plaques bezeichnet<sup>5</sup>. Bei dem Olmsted-Syndrom handelt es sich um eine von dem in dieser Arbeit diskutierten Phänotyp abzugrenzende Palmoplantarkeratose, da im Olmsted-Syndrom keine Loricrin-Mutation nachgewiesen werden konnte<sup>61</sup>.

Die Autorin gelangte auf der Basis der dargelegten Untersuchungen zu der Meinung, dass eine deskriptive Nomenklatur dem Eigennamen vorzuziehen ist. Dies sollte auch für den in dieser Arbeit erörterten und mit einer Loricrin-Mutation assoziierten Phänotyp umgesetzt werden. Die Autorin schlägt daher eine Bezeichnung nach den zwei Hauptmerkmalen vor: **honigwabenförmige Palmoplantarkeratose mit Ichthyose**<sup>18</sup>.

## 4.3 Standarddiagnostik für *LOR*

### 4.3.1 PCR und Sequenzierung

Die Hauptprobleme während der PCR-Etablierung bestanden darin, dass *LOR* zu großen Teilen aus CG-Dinukleotiden besteht und viele repetitive Sequenzen aufweist. Die Suche nach geeigneten Primerpaaren und die Etablierung der jeweils optimalen Reaktionsbedingungen waren daher sehr aufwändig. Dabei wurden vor allen Dingen der Annealing- und der Elongationsschritt erfolgreich verlängert. Das eingesetzte DMSO und Betain vermindern die Ausbildung von Sekundärstrukturen bei CG-reichen Sequenzen und setzen somit die Annealing-Temperatur der Primer herab<sup>8,24</sup>. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien individuell ausgetestet. Die

Bedingungen wurden mit DNA etabliert und waren auf cDNA übertragbar.

Zur Sequenzierung wurden mehrere Primer benötigt, da die Sequenzen jeweils nur über kürzere Abschnitte auswertbar waren und teilweise Polymorphismen in Form von Insertionen auftraten, die das Lesen der nachfolgenden Sequenz bei heterozygoten Fällen ausschlossen. Auch für die Sequenzreaktion konnte das Standardprotokoll nicht übernommen werden. Die Einführung eines zusätzlichen Denaturierungsschrittes bei 98 °C vor der Sequenzreaktion lieferte die saubersten Sequenzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sequenzierung von *LOR* bei Verdacht auf honigwabenförmige Palmoplantarkeratose mit Ichthyose oder Loricrin-Keratoderma als Standarddiagnostik angewandt werden konnte.

#### **4.3.2 RNA-Isolation**

Zuerst wurde die RNA-Isolation aus Blut durchgeführt. Die RNA des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P) ist in fast jeder Zelle vorhanden und kann daher gut als Kontrolle der Extraktion von RNA verwendet werden. Die Analyse ergab für die RNA der G6P eine ausreichende Menge zur Weiterverarbeitung. Für das Protein Loricrin konnten nur sehr geringe Mengen an RNA gewonnen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Loricrin ein gewebespezifisches Protein ist und demnach kaum in Blutbestandteilen exprimiert wird.

Anschließend erfolgte die Extraktion von RNA aus Haarwurzeln, da das CE in der äußeren Wurzelscheide der Haarwurzel sowie dem Isthmus, der Haarkutikula und dem Kanal nachgewiesen wurde<sup>22</sup>. Auch hier konnte RNA der G6P gut extrahiert werden. Obwohl Loricrin Teil des CE ist, konnten wieder nur sehr geringe Mengen RNA gewonnen werden. Daher ist davon auszugehen, dass Haarwurzelzellen nur wenig Loricrin exprimieren.

Als dritter Schritt erfolgte die Isolation von RNA aus Haut. Dabei war es möglich, sowohl RNA der G6P als auch Loricrin-RNA in ausreichenden Mengen zu isolieren. Dies lieferte einen weiteren Hinweis dafür, dass Loricrin hauptsächlich in der Haut exprimiert wird. Ein Nachteil dieser Methode ist es, dass die Hautprobengewinnung eine invasive Maßnahme darstellt.

Bei der Extraktion von RNA mittels „RNeasy® Protect Mini Kit“ aus Haarwurzeln und aus Haut wurde ungewollt ebenfalls DNA isoliert. Um ein reines RNA-Produkt zu

erhalten, war jeweils eine Inkubation mit DNase zur Reinigung notwendig. Nur bei der Extraktion von RNA aus Haut mit dem „RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit“ war auch ohne DNase-Verdau keine DNA-Kontamination vorhanden. Die systematischen Unterschiede in der ungewollten Isolierung von DNA wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Die Analyse von Loricrin-RNA durch RT-PCR und Sequenzierung war noch schwieriger als die Analyse auf der Basis von DNA. Aufgrund dessen empfiehlt es sich, zur Standarddiagnostik DNA einzusetzen. Besteht der Wunsch, auf RNA-Ebene Untersuchungen durchzuführen, sollte Loricrin-RNA aus Hautproben extrahiert werden.

#### **4.3.3 Pyrosequenzierung**

Die Pyrosequenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung der Expression der beiden Allele des Gens *LOR* benutzt. Bei der Etablierung traten zwei große Probleme auf. Auf der einen Seite musste genügend PCR-Produkt zur Weiterverarbeitung vorhanden sein. Auf der anderen Seite durften nur wenige Störfaktoren, wie z. B. Biotin-markierte Primer, im PCR-Produkt übrig bleiben, um saubere Signale zu erhalten.

Der anfänglich verwandte Primer LOR\_P\_F bindet in dem Bereich des Pyrosequenzierungsprimers LOR\_SNP. Dies erwies sich als ungünstig, da die Pyrogramme zu schwache Signale zeigten.

Da der Sequenzprimer für die Pyrosequenzierung direkt vor dem zu untersuchendem SNP liegen musste, wurden neue PCR-Primer entworfen. Das für die PCR letztendlich verwendete Primerpaar LOR\_AC\_F und LOR\_P\_Bio amplifizierte eine für die Pyrosequenzierung sehr lange Sequenz von 353 Basenpaaren. Trotzdem waren hier die Signale in den Pyrogrammen stärker, und es musste nur die einfache Produktmenge eingesetzt werden. Außerdem schien die dem Primer LOR\_AC\_F vorangestellte Base T das Bilden von Sekundärstrukturen der Einzelstränge zu erschweren und so zu sauberen Pyrogrammen beizutragen.

Im weiteren Verlauf führten sowohl die Gelaufreinigung mit „Millipore Ultrafree®-DA“ als auch die Zugabe von SSBP zu sauberen Pyrogrammen. Allerdings bedingte die Gelaufreinigung durch das Ausschneiden des Produktes Verluste. Daher waren die Signale in den Pyrogrammen der Proben mit SSBP-Zugabe etwas stärker. SSBP

verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen. Zusätzlich verhindert das SSBP wahrscheinlich auch das unspezifische Binden noch vorhandener PCR-Primer. Deshalb ist davon auszugehen, dass die anfänglichen Störsignale durch unspezifisch bindende PCR-Primer verursacht wurden.

Es besteht die Möglichkeit, durch Pyrosequenzierung eine Insertion direkt im Pyrogramm darzustellen. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Mutation handelt es sich jedoch um die Insertion eines siebten nach sechs vorausgegangenen Guaninen. In der Pyrosequenzierung werden aufeinander folgende Basen in einem einzigen Signal mit proportionaler Größe im Pyrogramm dargestellt. Da die Genauigkeit jedoch mit der Länge der repetitiven Sequenz abnimmt, erweist es sich als schwierig, zwischen sechs und sieben aufeinander folgenden Basen zu unterscheiden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Mutationsstelle nicht für diese Anwendung der Pyrosequenzierung geeignet ist.

Außerdem hatte die Pyrosequenzierung für das CG-reiche Gen *LOR* die zusätzliche Problematik einer sehr langen Etablierungsphase. Deshalb sollte diese Methode nicht zur Standarddiagnostik verwendet, sondern das Gen gleich vollständig im Kettenabbruchverfahren sequenziert werden.

## **4.4 Mutationsauswirkungen**

### **4.4.1 Expression des veränderten Loricrins**

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, herauszufinden, wie stark *LOR* auf RNA-Ebene exprimiert wird. Die Tatsache, dass modifizierte Loricrin generell exprimiert wurde, hatten bereits Maestrini und Mitarbeiter aufgezeigt<sup>50</sup>. Durch quantitative Pyrosequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass, im Vergleich zur DNA, die mutierte *LOR*-RNA mit 2,8% nur unwesentlich schwächer synthetisiert wurde. Es konnte mit Hilfe dieser Arbeit bestätigt werden, dass bei Patienten mit honigwabenförmiger PPK mit Ichthyose bzw. Loricrin-Keratoderma das mutierte sowie das Wildtyp-Allel gleich stark exprimiert werden. Diese Annahme lag auch dem transgenen Mausmodell zu Grunde<sup>75</sup>. Demzufolge stellen die homozygot transgenen Mäuse ein realistisches Modell für das humane Krankheitsbild Loricrin-Keratoderma dar.

#### 4.4.2 Auswirkungen des veränderten Loricrins

Es wird davon ausgegangen, dass Profilaggrin eine wichtige Rolle in der terminalen Differenzierung der Keratinozyten und somit der Keratinisierung spielt. Das aminoterminal Ende von Profilaggrin besteht aus einer sauren A-Domäne, die  $\text{Ca}^{2+}$  bindet, und einer basischen B-Domäne. Außerdem hat Profilaggrin eine zweiteilige nukleäre Kernzielsequenz. Im Verlauf der Keratinisierung gruppiert sich der Aminoterminus von Profilaggrin im Kern um die fragmentierte DNA<sup>33</sup>. Das gesamte veränderte Loricrin wandert in den Nukleus, wie bei Mäusen gezeigt werden konnte, die nur das mutierte menschliche Gen tragen<sup>75</sup>. Dort umgibt es den Aminoterminus von Profilaggrin und ist selbst in den oberflächlich gelegenen Zellen noch zu beobachten. Die Interaktion von verändertem Loricrin, Profilaggrin und DNA wird als Grund der fehlenden terminalen Differenzierung der Keratinozyten und somit als Störung der Keratinisierung angesehen. Daher wird die Mutation in *LOR* auch als „gain-of-function“-Mutation bezeichnet, da das aus der Mutation resultierende Proteinprodukt eine neue Funktion erlangt. Die Mechanismen, welche dazu führen, dass Profilaggrin und das veränderte Loricrin im Kern bleiben, sind bisher nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass ionische Interaktionen mit Nukleinsäuren eine Rolle spielen, da die B-Domäne von Profilaggrin und das veränderte Loricrin stark positiv geladen sind<sup>33</sup>.

#### 4.4.3 Hinweise auf ein „Backup“-System

Das CE besteht zu einem großen Teil aus Loricrin. Daher würden dramatische Folgen beim vollständigen Fehlen von Loricrin zu erwarten sein. Dies ist allerdings bei *Lor*-/- „knock-out“-Mäusen, die kein Loricrin exprimieren, nicht der Fall. Diese Tiere zeigen keine Abnormalitäten in Dicke, Entwicklung und Differenzierung des CE. Es ist auch keine Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) zu beobachten. Auffällig sind nur eine erhöhte Anfälligkeit des CE gegenüber mechanischem Stress sowie erhöhte Neigung zur Desquamation. Dabei ist die mechanische Stabilität der Haut von „knock-out“-Mäusen nicht signifikant eingeschränkt, da die Pfoten keine mikroskopischen Läsionen zeigten<sup>40</sup>.

Auch bei Loricrin-Keratoderma-Patienten zeigte sich zwar eine erhöhte Brüchigkeit der Korneozyten und eine erhöhte Anfälligkeit der Haut für mechanischen Stress, es waren aber keine klinischen Zeichen von erhöhter Hautvulnerabilität wie Blasenbildung oder

Anfälligkeit für Verletzungen zu beobachten. Auch scheint sich die Struktur des CE im äußeren Stratum corneum zu normalisieren. Im inneren Stratum corneum weist das CE nur 30% der normalen Dicke auf, im äußeren Stratum corneum erreicht es immerhin 60% der normalen Dicke<sup>70</sup>. Dies sind Hinweise auf die Existenz eines „Backup“-Systems. Wahrscheinlich wird dieses „Backup“-System jedoch verspätet aktiviert, da die embryonischen *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäuse eine langsamer einsetzende Entwicklung der Hautbarriere zeigen. Zusätzlich weisen die neugeborenen Mäuse einen transienten Phänotyp auf<sup>40</sup>. Es kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass ein „Backup“-System existiert, welches die Funktion von Loricrin übernimmt. Proteine, die Bestandteil dieses „Backup“-Systems sein könnten, sind:

- *SPRR2*
- *Repetin*
- Eine unbekannte, neue Familie an glycin- und serinreichen Proteinen

Diese Proteine werden bei *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen vermehrt exprimiert<sup>35,40</sup>.

#### **4.4.4 Verändertes Loricrin in Zusammenhang mit dem „Backup“-System**

Basierend auf der Annahme eines bestehenden „Backup“-Systems überraschte der vergleichsweise schwer ausgeprägte Phänotyp der Mäuse der F2-Generation, welche aus der Paarung von transgenen Mäusen mit *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen hervorgeht (Abschnitt 1.4.3)<sup>75</sup>. Dies führte zu der Überlegung, dass das modifizierte Loricrin auf noch nicht bekannte Weise auch das vermutete „Backup“-System beeinträchtigen könnte. Dafür sprechen auch weitere Erkenntnisse über die Dicke des CE. So ist beispielsweise das CE bei Loricrin-Keratoderma-Patienten dünner<sup>30,41</sup> und erreicht maximal 60% der eigentlichen Dicke<sup>70</sup>. Bei *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen hingegen sieht das CE normal aus und hat die normale Dicke von 15 nm mit sehr ähnlicher Masse pro Unit<sup>35</sup>. Ein weiterer Punkt, der diese These unterstützt, ist der TEWL, dessen Erhöhung einen Defekt in der Permibilitätsbarriere anzeigt. So wurde bei *Lor*<sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen beim TEWL keine Abnormalitäten beobachtet<sup>40</sup>. Transgene Mäuse und Loricrin-Keratoderma-Patienten zeigten hingegen eine Erhöhung des TEWL und somit einen Defekt in der Permiabilitätsbarriere<sup>70,75</sup>.

## 4.5 Fazit der Diskussion

Bei der Bezeichnung Loricrin-Keratoderma handelt es sich um eine genetische Nomenklatur. Als klinische Bezeichnung hingegen wird häufig der Begriff mutilierende Palmoplantarkeratose mit Ichthyose verwendet. Für Loricrin-Keratoderma können eine honigwabenförmige Palmoplantarkeratose und eine Ichthyose als Hauptmerkmale definiert werden. Darüber hinaus können als Nebenmerkmale Pseudoainhums, Autoamputationen, Geburt als Kollodiumbaby, prominente Fingerknöchel sowie Hyperkeratosen in Bereichen wie den Knien und den Ellenbögen auftreten. Die Autoamputationen kommen bei nur knapp einem Drittel der Patienten mit Loricrin-Keratoderma vor. Daraus ergibt sich die Folgerung, die Bezeichnung mutilierende Palmoplantarkeratose dem Olmsted-Syndrom vorzubehalten. Weiterführend schlägt die Autorin vor, im Zusammenhang mit Loricrin-Keratoderma die klinische Nomenklatur honigwabenförmige Palmoplantarkeratose mit Ichthyose zu verwenden, die die Hauptsymptome dieser PPK berücksichtigt.

Für die molekulare Standarddiagnostik von honigwabenförmiger Palmoplantarkeratose mit Ichthyose bzw. Loricrin-Keratoderma kann die Sequenzierung von DNA-Proben verwandt werden. Die in dieser Arbeit darüber hinaus angewandten Methoden, wie beispielsweise die Pyrosequenzierung, eignen sich eher zu Forschungszwecken, da aufgrund des CG-Reichtums von *LOR* eine sehr lange Etablierungsphase notwendig ist. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Familie MDC-804 mit nachgewiesener Mutation 730insG handelt es sich um eine „gain-of-function“-Mutation. Das veränderte Loricrin wandert dabei im Stratum granulosum in den Kern und verhindert somit die terminale Differenzierung der Keratinozyten<sup>31,33</sup>. Des Weiteren behindert das veränderte Loricrin wahrscheinlich das „Backup“-System, welches die Funktion des Wildtyp-Loricrins übernimmt. Bei dieser „gain-of-function“-Mutation werden das Wildtyp-Allel sowie das mutierte Allel zu gleichen Teilen exprimiert. Diese Tatsache belegt die Annahme des transgenen Mausmodells<sup>75</sup>, welches darauf beruht, dass sowohl Wildtyp-Allel und mutiertes Allel gleichermaßen exprimiert werden.



## 5 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die klinische sowie molekulargenetische Untersuchung einer Familie, bei welcher die Verdachtsdiagnose autosomal dominante lamelläre Ichthyose gestellt wurde. Eine im Vorfeld erfolgte genomweite Kartierung der Familie MDC-804 hatte einen maximalen Lod-Wert 2,8 für den Marker bei D1S498 auf Chromosom 1 ergeben. Mit den Daten der genomweiten Kartierung wurde eine Haplotypisierung mit anschließender Feinkartierung durchgeführt. Die Kandidatengenregion konnte damit auf einen Abschnitt von 23,4 cM eingegrenzt werden, in dem sich der epidermale Differenzierungskomplex (EDC) befand. Hier lag auch das für den Aufbau des „cornified envelope“ wichtige Gen *LOR*. Eine direkte Sequenzierung von *LOR* ergab die Mutation 730insG, die das Protein Loricrin um 22 Aminosäuren verlängert. Diese Mutation war in der Literatur dem Vohwinkel-Syndrom Typ Camisa zugeordnet und begründete die Diagnose Loricrin-Keratoderma. Aufgrund des Mutationsfundes und der Reevaluation der klinischen Merkmale wurde im Folgenden die Verdachtsdiagnose autosomal dominante lamelläre Ichthyose für die untersuchte Familie verworfen. Die Nachuntersuchung sowie die vergleichende Literaturanalyse führten zu folgenden Schlussfolgerungen: Für Loricrin-Keratoderma können eine honigwabenförmige Palmoplantarkeratose sowie eine leichte Ichthyose als Hauptmerkmale definiert werden. Als Nebenmerkmale wurden Pseudoainhums, Autoamputationen, Geburt als Kollodiumbaby, prominente Fingerknöchel sowie Hyperkeratosen an Knien und Ellenbögen herausgearbeitet. Basierend auf der klinischen Untersuchung der beschriebenen Familie sowie der Literaturrecherche werden Pseudoainhums hier erstmalig als fakultatives und Autoamputationen als Nebenmerkmal definiert. Somit ist die bisherige Nomenklatur mutilierende Keratoderma nicht treffend.

Diese genetisch als Loricrin-Keratoderma definierte Verhornungsstörung sollte nach den Ergebnissen dieser Arbeit aus klinischer Sicht als honigwabenförmige Palmoplantarkeratose mit Ichthyose bezeichnet werden.

Durch direkte Sequenzierung wurde nachgewiesen, dass Familien mit autosomal dominanter lamellärer Ichthyose keine Mutationen in *LOR* aufwiesen. Damit handelt es sich bei der autosomal dominanten lamellären Ichthyose mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um eine Loricrin-Keratoderma.

Es gelang, eine molekulargenetische Standarddiagnostik zu etablieren. Die dafür als optimal eingestufte Methode stellt die direkte Sequenzierung an Patienten-DNA dar. Eine RNA-Untersuchung, für die RNA-Extraktion aus der Haut notwendig ist, ist für eine Standarddiagnostik nicht geeignet und bleibt Forschungszwecken vorbehalten.

Ein dritter Teil dieser Arbeit hatte die Expressionsanalyse mittels Pyrosequenzierung zum Gegenstand. An einem Einzelnukleotid-Polymorphismus konnten DNA- und RNA-Proben einer Patientin quantitativ untersucht werden. Hierbei ergab sich eine gleichwertige Expression von mutiertem und Wildtyp-Allel. Dieses Ergebnis unterstützt die momentan vorherrschende „gain-of-function“-Theorie des veränderten Loricrins. Auch ein zur Imitation von Loricrin-Keratoderma entworfenes transgenes Mausmodell geht von einer gleichstarken Expression von mutiertem und Wildtyp-Loricrin-Allel aus. Diese Annahme konnte durch die hier vorgelegten Untersuchungen an einer Patientin bestätigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Akiyama M, Christiano AM et al.: Abnormal cornified cell envelope formation in mutilating palmoplantar keratoderma unrelated to epidermal differentiation complex. *J.Invest Dermatol.* 1998, *111*: 133-38
- 2 Akiyama M, Sawamura D und Shimizu H: The clinical spectrum of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar ichthyosis. *Clin.Exp.Dermatol.* 2003, *28*: 235-40
- 3 Al Aboud K, Al Hawsawi K und Ramesh V: Bilateral pseudoainhum in lamellar ichthyosis. *Pediatr.Dermatol.* 2004, *21*: 181
- 4 Armstrong DK, McKenna KE und Hughes AE: A novel insertional mutation in loricrin in Vohwinkel's Keratoderma. *J.Invest Dermatol.* 1998, *111*: 702-04
- 5 Atherton DJ, Sutton C und Jones BM: Mutilating palmoplantar keratoderma with periorificial keratotic plaques (Olmsted's syndrome). *Br.J.Dermatol.* 1990, *122*: 245-52
- 6 Bergman R, Bitterman-Deutsch O, et al.: Mal de Meleda keratoderma with pseudoainhum. *Br.J.Dermatol.* 1993, *128*: 207-12
- 7 BLAST: 27.02.2003 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- 8 Bookstein R, Lai CC, et al.: PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic.Acids.Res* 1990, *18*: 1666
- 9 Brambilla L, Pigatto PD, et al.: Unusual cases of Meleda keratoderma treated with aromatic retinoid etretinate. *Dermatologica* 1984, *168*: 283-86
- 10 Braun-Falco O, Plewig G und Wolff HH: *Dermatologie und Venerologie* 4. Berlin, Springer, 1996 671-687 3-540-53542-X
- 11 Camisa C, Rossana C: Variant of keratoderma hereditaria mutilans (Vohwinkel's syndrome). Treatment with orally administered isotretinoin. *Arch.Dermatol.* 1984, *120*: 1323-28
- 12 Camisa C, Williams H: Epidermolytic variant of hereditary palmoplantar keratoderma. *Br.J.Dermatol.* 1985, *112*: 221-25
- 13 Dornier C, Cuny,J.F, et al.: [Pseudoainhum in lamellar ichthyosis]. *Ann.Dermatol.Venereol.* 2001, *128*: 1037-39

- 14 Eckl KM, Krieg P, et al.: Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis. Hum.Mutat. 2005, 26: 351-61
- 15 Ena P, Pinna A: Lamellar ichthyosis associated with pseudoainhum of the toes and eye changes. Clin.Exp.Dermatol. 2003, 28: 493-95
- 16 Fischer J, Bouadjar B, et al.: Mutations in the gene encoding SLURP-1 in Mal de Meleda. Hum.Mol.Genet. 2001, 10: 875-80
- 17 Fritsch P: Dermatologie, Venerologie - Grundlagen. Klinik. Atlas. 2. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 2004 4-17 3-540-00332-0
- 18 Gedicke MM, Traupe H, et al.: Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in loricrin: Analysis of a family and review of the literature. Br.J.Dermatol, 2006, 154: 167-71
- 19 Genetic map Chromosom 1: 01.10.2004  
[http://www2.marshfieldclinic.org/RESEARCH/GENETICS/Map\\_Markers/maps/IndexMapFrames.html](http://www2.marshfieldclinic.org/RESEARCH/GENETICS/Map_Markers/maps/IndexMapFrames.html)
- 20 Griffiths WAD, Judge MR and Leigh MI: Disorders of Keratinization. Hrsg.: Champion RH, Burton JL, et al.: Textbook of Dermatology Band 2. 6. Oxford, Blackwell Science, 1998 1483-1589 0-632-03796-2
- 21 Hart TC, Hart PS, et al: Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. J.Med.Genet. 1999, 36: 881-87
- 22 Hashimoto K: The structure of human hair. Clin.Dermatol. 1988, 6: 7-21
- 23 Hau R: PONS Standardwörterbuch Lateinisch 1. Stuttgart, Ernst Klett, 1992 1-290 3-12-517520-8
- 24 Henke W, Herdel K, et al.: Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3957-58
- 25 Hohl D: persönliche Kommunikation, 01.11.2004
- 26 Hohl D: [A new star in the heavens of epidermal proteins: loricrin--what is it?]. Hautarzt 1990, 41: 299-301
- 27 Hohl D: Cornified cell envelope. Dermatologica 1990, 180: 201-11
- 28 Hohl D, Mehrel T, et al.: Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. J.Biol.Chem. 1991, 266: 6626-36

- 29 Huber M, Rettler I, et al.: Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 1995, 267: 525-28
- 30 Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, et al.: The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *Am.J.Hum.Genet.* 1997, 61: 581-89
- 31 Ishida-Yamamoto A, Kato H, et al.: Mutant loricrin is not crosslinked into the cornified cell envelope but is translocated into the nucleus in Loricrin keratoderma. *J.Invest Dermatol.* 2000, 115: 1088-94
- 32 Ishida-Yamamoto A, Takahashi H und Iizuka H: Loricrin and human skin diseases: molecular basis of Loricrin keratodermas. *Histol.Histopathol.* 1998, 13: 819-26
- 33 Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, et al.: Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and Loricrin keratoderma. *Lab Invest* 1998, 78: 1245-53
- 34 Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, et al.: Programmed cell death in normal epidermis and Loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1999, 4: 145-49
- 35 Jarnik M, de Viragh PA, et al.: Quasi-normal cornified cell envelopes in loricrin knockout mice imply the existence of a loricrin backup system. *J.Invest Dermatol.* 2002, 118: 102-09
- 36 Jobard F, Lefevre C, et al.: Lipoyxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoyxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum.Mol.Genet.* 2002, 11: 107-13
- 37 Judge MR, Harper JI: The ichthyoses. Hrsg.: Harper J: *Inherited Skin Disorders - The Genodermatoses* 1. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1996 73-78 0-7506-1416-1
- 38 Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie* 4. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 1996 412-420 3-540-60404-9
- 39 Kalinin AE, Kajava AV und Steinert PM: Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 2002, 24: 789-800
- 40 Koch PJ, de Viragh PA, et al.: Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J.Cell Biol.* 2000, 151: 389-400

- 41 Korge BP, Ishida-Yamamoto A, et al.: Loricrin mutation in Vohwinkel's keratoderma is unique to the variant with ichthyosis. *J.Invest Dermatol.* 1997, 109: 604-10
- 42 Krieg P, Schuppler M, et al.: Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 1997, 43: 339-48
- 43 Küster W, Becker A: Indication for the identity of palmoplantar keratoderma type Unna-Thost with type Vorner. Thost's family revisited 110 years later. *Acta Derm.Venereol.* 1992, 72: 120-22
- 44 Küster W, Fritsch P und Happle R: Hereditäre Verhornungsstörungen. Hrsg.: Fritsch P: *ermatologie, Venerologie - Grundlagen. Klinik. Atlas. 2.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 2004 550-56 3-540-00332-0
- 45 Landau M, Cohen-Bar-Dayana M, et al.: Erythrokeratoderma variabilis with erythema gyratum repens-like lesions. *Pediatr.Dermatol.* 2002, 19: 285-92
- 46 Larregue M, Callot V, et al.: Olmsted syndrome: report of two new cases and literature review. *J.Dermatol.* 2000, 27: 557-68
- 47 Lefèvre C, Audebert S et al.: Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum.Mol.Genet.* 2003, 12: 2369-2378
- 48 Lefèvre C, Bouadjar B et al.: Mutations in ichthyin a new gene on chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum.Mol.Genet.* 2004, 13: 2473-2482
- 49 Maestrini E, Korge BP et al.: A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum.Mol.Genet.* 1999, 8: 1237-43
- 50 Maestrini E, Monaco AP, et al.: molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome. *Nat.Genet.* 1996, 13: 70-77
- 51 Marenholz I, Volz A, et al.: Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, and a 6-Mb YAC contig. *Genomics* 1996, 37: 295-302
- 52 Mashhood AA, Humayun A, et al.: Papillon-Lefevre syndrome associated with pseudoainhum. *J.Am.Acad.Dermatol.* 2004, 51: S134-S136

- 53 Matsumoto K, Muto M, et al.: Loricrin keratoderma: a cause of congenital ichthyosiform erythroderma and collodion baby. *Br.J.Dermatol.* 2001, 145: 657-60
- 54 Menge H, Schäfer K-H und Zimmermann B: Langenscheidts Taschenwörterbuch, Altgriechisch 9. Langenscheidt, 2002 3468110324
- 55 Munro C: persönliche Kommunikation, 18.10.2004
- 56 National Human Genome Research Institute: 29.12.2004 <http://www.genome.gov/>
- 57 NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 58 NCBI genome annotation: Build 35 version 1 NCBI, 19.08.2004  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NT004487from=3722555&to=3724953&view=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NT004487from=3722555&to=3724953&view=genbank)
- 59 Novice FM, Collison DW, et al.: Handbook of Genetic Skin Disorders 1. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1994 67 0-7216-3803-1
- 60 O'Driscoll J, Muston GC, et al.: A recurrent mutation in the loricrin gene underlies the ichthyotic variant of Vohwinkel syndrome. *Clin.Exp.Dermatol.* 2002, 27: 243-46
- 61 Ogawa F, Udono M, et al.: Olmsted syndrome with squamous cell carcinoma of extremities and adenocarcinoma of the lung: failure to detect loricrin gene mutation. *Eur.J.Dermatol.* 2003, 13: 524-28
- 62 Olmsted HC: Keratoderma palmaris et plantaris congenitalis. Report of a case showing associated lesions of unusual location. *Am.J.Dis.Child* 1927, 33: 758-64
- 63 Paige DG, Harper JI: Erythrokeratodermas, follicular keratoses, palmoplantar keratodermas and porokeratoses. Hrsg.: Harper J: Inherited Skin Disorders - The Genodermatoses 1. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1996 97-110 0-7506-1416-1
- 64 Primer 3: 27.02.2003 [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
- 65 Pyrosequencing: 19.09.2004  
<http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454>
- 66 Reis A, Hennies HC, et al.: Keratin 9 gene mutations in epidermolytic palmoplantar keratoderma (EPPK). *Nat.Genet.* 1994, 6: 174-79
- 67 Richard G: Molecular genetics of the ichthyoses. *Am.J.Med.Genet.* 2004, 15: 32-44
- 68 Rossmann-Ringdahl I, Anton-Lamprecht I und Swanbeck G: A mother and two children with nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch.Dermatol.* 1986, 122: 559-64

- 69 Russell LJ, DiGiovanna JJ, et al.: Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat.Genet.* 1995, 9: 279-83
- 70 Schmuth M, Fluhr JW, et al.: Structural and functional consequences of loricrin mutations in human Loricrin keratoderma (Vohwinkel syndrome with ichthyosis). *J.Invest Dermatol.* 2004, 122: 909-22
- 71 Smolle J: Grundlagen der Dermatologie. Hrsg.: Henz BM, Kerl H et al.: Dermatologie und Venerologie 2 Berlin, Heidelberg, New York, de Gruyter, 1997 Abb 1.1 3-11-015123-5
- 72 Steinert PM, Marekov LN: The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J.Biol.Chem.* 1995, 270: 17702-11
- 73 Steinert PM, Marekov LN: Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J.Biol.Chem.* 1997, 272: 2021-30
- 74 Strachan T, Read AP: Human Molecular Genetics 2 Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999 online
- 75 Suga Y, Jarnik M, et al.: Transgenic mice expressing a mutant form of loricrin reveal the molecular basis of the skin diseases, Vohwinkel syndrome and progressive symmetric erythrokeratoderma. *J.Cell Biol.* 2000, 151: 401-12
- 76 Takahashi H, Ishida-Yamamoto A et al.: Loricrin gene mutation in a Japanese patient of Vohwinkel's syndrome. *J.Dermatol.Sci.* 1999, 19: 44-47
- 77 Thiele H, Nürnberg G und Hennies HC: persönliche Kommunikation,
- 78 Thost A: Über erbliche Ichthyosis palmaris et plantaris cornea Heidelberg, Inaug Diss, 1880
- 79 Toomes C, James J, et al.: Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat.Genet.* 1999, 23: 421-24
- 80 Torchard D, Blanchet-Bardon C, et al.: Epidermolytic palmoplantar keratoderma cosegregates with a keratin 9 mutation in a pedigree with breast and ovarian cancer. *Nat.Genet.* 1994, 6: 106-10
- 81 Toribio J, Fernandez, Redondo V, et al: Autosomal dominant lamellar ichthyosis. *Clin.Genet.* 1986, 30: 122-26



- 82 Traupe H: The ichthyoses : a guide to clinical diagnosis, genetic counseling, and therapy Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 1989 111-134
- 83 Traupe H: The Genetic Ichthyoses. Hrsg.: Harper J, Oranje A und Prose N: Textbook of Pediatric Dermatology Band 2. 1 Oxford, Blackwell Science, 2000 1108-09 0-86542-939-1
- 84 Traupe H, Kolde G und Happle R: Autosomal dominant lamellar ichthyosis: a new skin disorder. Clin.Genet. 1984, 26: 457-61
- 85 Unna PG: Über das Keratoma palmare et plantare hereditarium. Dermatol.Syphil. 1883, 15: 231-70
- 86 Vohwinkel KH: Keratoderma hereditaria mutilans. Ach.Dermatol.Syphil. 1929, 158: 354-64
- 87 Volz A, Korge BP, et al.: Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. Genomics 1993, 18: 92-99
- 88 Vörner H: Zur Kenntniss des Keratoma hereditarium palmare et plantare. Ach.Dermatol.Syph. 1901, 56: 3-31
- 89 Williams ML, Elias PM: Ichthyosis. Genetic heterogeneity, genodermatoses, and genetic counseling. Arch.Dermatol. 1986, 122: 529-31
- 90 Yoneda K, Hohl D, et al.: The human loricrin gene. J.Biol.Chem. 1992, 267: 18060-66
- 91 Yoneda K, Steinert PM: Overexpression of human loricrin in transgenic mice produces a normal phenotype. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1993, 90: 10754-58

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Keratinisierung der Epidermis <sup>71</sup>	2
Abb. 2: Paarung transgener Mäuse mit <i>Lor</i> <sup>-/-</sup> „knock-out“-Mäusen	8
Abb. 3: Das Prinzip der Pyrosequenzierung	12
Abb. 4: Stammbaum mit Haplotypen der Familie MDC-804	33
Abb. 5: Verwendete Primer	37
Abb. 6: Mutation 730insG	37
Abb. 7: Wildtyp	37
Abb. 8: Stammbaum Familie B-4555	38
Abb. 9: Stammbaum Familie B-4571	39
Abb. 10: Stammbaum Familie B-4565	39
Abb. 11: Stammbaum Familie B-4601	40
Abb. 12: Patientin 18, honigwabenförmige Palmoplantarkeratose ohne Konstrikturen der Finger mit Lichenifikationen über dem Handgelenk	42
Abb. 13: Patientin 18, Lichenifikationen in der Ellenbeuge	42
Abb. 14: Patientin 20, prominente Fingerknöchelverdickungen	43
Abb. 15: DNA Kontamination bei RNA aus Blut	48
Abb. 16: RNA-Extraktion aus Blut	49
Abb. 17: RNA-Extraktion aus Haarwurzeln	49
Abb. 18: RNA-Extraktion aus Haarwurzeln	50
Abb. 19: RNA-Extraktion aus Haut	50
Abb. 20: RNA-Extraktion aus Haut	51
Abb. 21: der Familie MDC-804 Stammbaum mit Haplotypen für die Pyrosequenzierung	52
Abb. 22: Pyrogramm; RNA aus Haut der Patientin 16 mit Reverser Transkriptase	56
Abb. 23: Pyrogramm; Leerkontrolle RNA aus Haut der Patientin 16 ohne Reverse Transkriptase	56
Abb. 24: Pyrogramm; DNA der Patientin 16	56
Abb. 25: Prozentuale Verteilung der Allelkonzentrationen	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Primer	21
Tabelle 2: Merkmalauswertung für publizierte Familien	45
Tabelle 3: Merkmalauswertung Individuen der publizierten Familien	46

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Sperling, danke ich sehr herzlich für die Bereitschaft, dieses Projekt mit zu betreuen, und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Hennies und Frau Dr. Tinschert für das Überlassen des Themas, die Ermutigung zum wissenschaftlichen Arbeiten, ihre hilfsbereite Unterstützung und konstruktive Kritik. Sie haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die freundliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Genkartierungszentrums im Max-Delbrück-Centrum, insbesondere bei Björn Fischer, Françoise André, Anja Brinckmann und Katja M. Eckl.

Des Weiteren gilt mein Dank vor allem den Patientinnen und Patienten sowie ihren Familien. Ohne ihr freundliches Entgegenkommen und Bereitstellen der Proben wäre der experimentelle Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Zum Schluss danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung, besonders meinem Bruder für die Instandhaltung meines Computers, und meinen Freundinnen und Freunden für ihr Verständnis, vor allen Dingen Julia A. Böck, Isabella Thiesen und Elisa Suijkerbuijk.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Angaben**

Malenka Mona Gedicke, geboren am 11.03.1981 in Berlin

## **Ausbildung**

1997 - 1998	Sixth form, Greensward School, England
1998 - 2000	Allgemeine Hochschulreife Erich-Hoepner-Gymnasium
Seit 2000	Studiums der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
2002	Ärztliche Vorprüfung
2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006	voraussichtlich dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Ende des Studiums

## **Publikationen**

2003	Gedicke MM, Thiele H, Nürnberg P, Traupe H, Tinschert S, Hennies HC; Towards the characterisation of Loricrin keratoderma: diffuse and generalised ichthyosis associated with a loricrin frameshift mutation. Med.Genet. 2003, 15: 325
2004	Gedicke MM, Iblher H, Linderer A, Wolf R, Breckwoldt J; 4-stufiges Teach-the-teacher-Konzept in der Erste-Hilfe-Ausbildung für Medizinstudierende. Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung (GMA). Berlin. 2004
2006	Gedicke MM, Traupe H, Fischer B, Tinschert S, Hennies HC; Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in loricrin: Analysis of a family and review of the literature. Br.J.Dermatol. 2006, 154: 167-71

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Malenka Mona Gedicke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Loricrin-Keratoderma – klinische und molekulargenetische Charakterisierung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 14.08.2005

Malenka M Gedicke